

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

***“PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON
CÁNCER EN MENINGIOMAS Y SCHWANNOMAS”***

VÍCTOR MANUEL MARTÍNEZ GONZÁLEZ

MADRID. ENERO DE 2008

Hace cuatro años me recibió para iniciar este proyecto.

Hoy, con el trabajo terminado, quiero dedicarle esta tesis.

A la memoria de María Josefa Bello.

Agradezco a mi director de tesis, Juan Antonio Rey, por haber recogido el testigo en momentos difíciles.

Este proyecto ha llegado a buen puerto gracias a la inestimable colaboración técnica y científica de Juan Antonio Rey, Alberto Isla, Carolina Peña, Carmen Franco, Luis Álvarez y Pilar Martínez.

Y también quiero acordarme de todos vosotros. Por haber estado ahí, gracias.

ÍNDICE

	RESUMEN	5
1.	INTRODUCCIÓN	7
1.1.	MENINGIOMAS	8
1.1.1.	INCIDENCIA, PRESENTACIÓN Y ETIOLOGÍA	8
1.1.2.	DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	9
1.1.3.	CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO	10
1.1.4.	GENÉTICA DE LOS MENINGIOMAS	12
1.1.4.1.	GEN <i>NF2</i>	13
1.1.4.2.	OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA 4.1	15
1.1.4.3.	OTROS GENES EN EL CROMOSOMA 22	16
1.1.4.4.	OTROS GENES Y REGIONES CROMOSÓMICAS	18
1.2.	SCHWANNOMAS	22
1.2.1.	INCIDENCIA, PRESENTACIÓN Y ETIOLOGÍA	22
1.2.2.	CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO	24
1.2.3.	GENÉTICA DE SCHWANNOMAS	25
1.3.	MICROARRAYS	28
1.3.1.	MICROARRAYS EN MENINGIOMAS Y SCHWANNOMAS	31
2.	OBJETIVOS	36
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	38
3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	39
3.1.1.	MUESTRAS TUMORALES	39
3.1.2.	SANGRE PERIFÉRICA	39
3.1.3.	MUESTRAS CONTROL	39
3.2.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	40
3.2.1.	ADN	40
3.2.2.	ARN	40
3.2.3.	EXTRACCIÓN DE ARNm	41
3.3.	ESTUDIOS GÉNICOS	41
3.3.1.	ESTUDIO MUTACIONAL DEL GEN <i>NF2</i>	41
3.3.2.	POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA (SSCP)	42
3.3.3.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DESNATURALIZANTE DE ALTO RENDIMIENTO	42
3.3.4.	SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL ADN	43
3.3.5.	PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH) EN 22q	44
3.4.	AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE LIGASA	44
3.4.1.	MLPA DEL GEN <i>NF2</i>	44
3.4.2.	MS-MLPA	45
3.4.3.	ANÁLISIS DE MLPA Y MS-MLPA	46
3.5.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN	46
3.5.1.	MICROARRAYS	46
3.5.1.1.	PREHIBRIDACIÓN	47
3.5.1.2.	HIBRIDACIÓN	48
3.5.1.3.	LAVADOS	48
3.5.1.4.	ADQUISICIÓN DE IMAGEN Y DATOS	49
3.5.2.	EXPRESIÓN MEDIANTE RT-PCR SEMICUANTITATIVA	49
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MICROARRAYS	50
3.6.1.	NORMALIZACIÓN	50
3.6.2.	FILTRADO	50
3.6.3.	COMPARACIÓN DE CLASES Y SAM	50
3.6.4.	ANÁLISIS DE VARIABLES CUANTITATIVAS	51
3.6.5.	PREDICCIÓN DE CLASES	51
3.6.6.	REPRODUCIBILIDAD Y SIGNIFICACIÓN DE CLUSTER	52
3.6.7.	ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA (OG)	52
4.	RESULTADOS	54
4.1.	ANÁLISIS MUTACIONAL DE <i>NF2</i>	55
4.2.	PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD EN 22q	58
4.3.	MLPA DEL GEN <i>NF2</i>	58
4.4.	MLPA DE METILACIÓN	59
4.5.	MICROARRAYS DE EXPRESIÓN	60
4.5.1.	ANÁLISIS POR CLUSTER	60
4.5.2.	COMPARACIÓN DE CLASES Y SAM	63
4.5.3.	ANÁLISIS DE VARIABLES CUANTITATIVAS	73
4.5.4.	PREDICCIÓN DE CLASES	73
4.5.5.	ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA (OG)	75
5.	DISCUSIÓN	76
6.	CONCLUSIONES	96
7.	ANEXO I	99
8.	REFERENCIAS	108

RESUMEN

Los perfiles de expresión génica, determinados mediante la técnica de microarrays, son un sistema de análisis de alto rendimiento recientemente utilizado en la investigación básica y aplicada. Los microarrays permiten identificar genes diferencialmente expresados, establecer patrones de regulación génica y descubrir nuevos marcadores tumorales con aplicación en la práctica clínica y la terapéutica del cáncer. Los microarrays pueden ser utilizados como complemento a los métodos diagnósticos convencionales.

A pesar del actual conocimiento sobre la patogenia molecular de meningiomas y schwannomas, que comparten como característica molecular principal la alteración del gen *NF2*, la falta de datos sobre la historia natural de meningiomas y schwannomas no tratados, el reducido número de pacientes que requieren terapia adicional al tratamiento quirúrgico, así como la falta de líneas celulares y modelos animales fiables y robustos, han limitado hasta ahora el estudio molecular de estas neoplasias.

En este trabajo se utiliza la metodología de microarrays de ADNc para establecer los perfiles de expresión de 96 genes relacionados con cáncer en muestras tumorales obtenidas a partir de la extirpación quirúrgica de 42 meningiomas y 23 schwannomas. El estudio se complementa con el análisis mutacional del gen *NF2* (por medio de las técnicas de PCR, SSCP, dHPLC, Secuenciación y MLPA), la búsqueda de pérdida de heterocigosidad (LOH) del brazo largo del cromosoma 22 (por medio de Marcadores Microsatelitales) y el análisis de silenciamiento génico por hipermetilación aberrante de promotores génicos (por medio de la técnica de MS-MLPA).

Esta metodología permitió establecer el perfil de expresión génica de meningiomas y schwannomas, estableciendo relación con las alteraciones moleculares del gen *NF2*, la pérdida de heterocigosidad del brazo largo del cromosoma 22 y el grado tumoral. También permitió identificar marcadores moleculares con potencial diagnóstico, pronóstico y terapéutico.

Este trabajo ofrece una aproximación metodológica que permite conocer a gran escala los perfiles de expresión de meningiomas y schwannomas y establece genes diferencialmente expresados entre estos dos tipos tumorales y los controles de meninge normal. Aporta también un clasificador molecular para meningiomas con posibles repercusiones en evolución y vigilancia post-operatoria. Los datos de expresión obtenidos en este trabajo podrían también ser utilizados en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de estos dos tipos tumorales.

ABSTRACT

Microarray gene expression profiling is a high throughput system recently used in basic and applied research. In addition to the identification of differentially expressed genes and the establishment of gene regulation patterns, microarrays may also allow us to discover new tumor markers that could have great impact on the improvement of clinical practice and therapeutics in cancer. Microarrays may be used as a helpful complement to conventional diagnostic methods.

Besides the actual understanding on meningioma and schwannoma genetics —two tumor types that share as a main genetic aberration the alterations in *NF2* gene—, their molecular pathogenesis remains unclear and suitable molecular targets have to be identified. Lack of data on the natural history of untreated meningiomas and schwannomas, the small number of patients who require additional therapy to the surgical treatment, as well as the lack of robust and trustworthy cellular lines and animals models have limited until today the molecular study of these two tumor types.

This work uses cDNA microarray technology to establish expression patterns, of 96 cancer related genes, on 42 meningiomas and 23 schwannomas obtained by surgical resection. The study is complemented by the mutational analysis of *NF2* gene (by using PCR, SSCP, dHPLC, Sequencing and MLPA techniques), the search for loss of heterocigosity (LOH) on the long arm of chromosome 22 (Microsatellite Markers) and the analysis of gene silencing by aberrant gene promoter hypermethylation (MS-MLPA).

This methodology allowed the gene expression profiling of schwannomas and meningiomas, establishing correlations with molecular alterations in the *NF2* gene, the loss of heterocigosity in the long arm of chromosome 22 and the tumor grade, but also allowed us to identify molecular markers with diagnostic, prognostic and therapeutic potential.

This work provides a methodological approach that allows a large-scale expression profiling in schwannomas and meningiomas and establishes differentially expressed genes between these two tumor types and the cerebral meninges controls. This study provides a molecular classifier for meningiomas with possible implications for evolution and post-surgical surveillance. The expression data obtained in this work can also be used in the search for new therapeutic agents to treat meningiomas and schwannomas.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MENINGIOMAS

Los meningiomas son una de las neoplasias más ampliamente estudiadas debido a su alta incidencia e impacto social; inicialmente fueron abordados con técnicas histológicas y citogenéticas y posteriormente se fueron introduciendo técnicas moleculares o mixtas. Actualmente, la biología molecular, tanto a nivel génico como de expresión, nos aporta valiosas herramientas que nos permitirán optimizar el diagnóstico, clasificación, pronóstico y tratamiento de este tipo tumoral.

1.1.1. INCIDENCIA, PRESENTACIÓN Y ETIOLOGÍA

El término meningioma, acuñado por Harvey Cushing en 1938, se refiere a un grupo de tumores compuestos por células neoplásicas, probablemente derivadas de células menígeas de la capa aracnoide. Este tipo de neoplasia tiene una incidencia anual aproximada de 6 casos por cada 100 000 habitantes y constituye alrededor del 20% de todos los tumores intracraneales primarios (Louis et al. 2000b). No obstante, estudios efectuados en autopsias revelan que hasta un 2.3% de individuos presenta meningiomas asintomáticos no diagnosticados (Nakasu et al. 1987). Si bien es cierto que la mayoría de los tumores de este tipo son benignos, extra-parenquimatosos y de crecimiento lento, hasta un 20% muestra un comportamiento clínicamente agresivo, produciendo una morbilidad y mortalidad considerable (Perry et al. 1999). El pico de incidencia se encuentra entre la sexta y séptima década de vida. En pacientes de mediana edad, los meningiomas son particularmente más frecuentes en mujeres que en hombres, con una relación 2:1 respectivamente (Jaaskelainen, Haltia, and Servo 1986).

La mayoría de los meningiomas se encuentran adheridos a la duramadre y crecen en la cavidad intracraneal, el canal espinal y, con menor frecuencia, hacia las órbitas. Clínicamente, aproximadamente el 40% de los pacientes con meningiomas sufren convulsiones (Lamszus 2004), asimismo presentan otros

síntomas que dependen de la localización del tumor y la compresión de estructuras adyacentes, dando como resultado cefalea, déficit neurológico focal o trastornos neuropsicológicos.

Existe una gran variedad de factores endógenos y exógenos que predisponen al desarrollo de meningiomas (Louis et al. 2000b). Así, la mayoría de pacientes que sufren neurofibromatosis tipo II (NF2) desarrollan meningiomas (Baser, DG, and Gutmann 2003) y, este tipo de presentación difiere de los tumores esporádicos en varios aspectos: 1) usualmente aparecen a una edad varias décadas más temprano, 2) frecuentemente son múltiples y 3) pertenecen principalmente a la variante fibroblástica. Asimismo, se han descrito familias con una susceptibilidad incrementada a padecer meningiomas pero no el síndrome NF2 (Louis, Ramesh, and Gusella 1995).

Los meningiomas múltiples se observan en un 1-8% de pacientes con este tipo tumoral y son muy frecuentes en pacientes con el síndrome NF2 y en meningiomas familiares no NF2. Por otra parte, también se ha observado una mayor incidencia de meningiomas intracraneales posteriores a irradiación profiláctica o terapéutica (Choudhary et al. 2006). Otro factor descrito es la asociación entre meningiomas y receptores hormonales, como el receptor de progesterona (Jhawar et al. 2003), donde se ha observado una relación inversa entre la expresión de dicho receptor y el grado histológico tumoral. Por lo tanto, la presencia de estos receptores se considera como un factor de buen pronóstico (Konstantinidou et al. 2003; Hsu, Efird, and Hedley-Whyte 1997).

1.1.2. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

El diagnóstico de los meningiomas se puede realizar mediante técnicas radiográficas que detectan signos de calcificación, hiperostosis o signos de hipertensión intracraneal crónica. Mediante el uso de la tomografía axial computarizada (TAC) con contraste, los meningiomas se pueden ver como lesiones hiperdensas y se hacen evidentes las calcificaciones tumorales. La capacidad multiplanar y de resolución de la imagen por resonancia magnética (RMI) la hacen la técnica idónea para delimitar la masa tumoral e incluso su vascularización y diseminación por el líquido cefalorraquídeo (LCR).

El tratamiento quirúrgico sigue siendo lo habitual y, en muchos casos, es precedido por embolización. La radiocirugía estereotáctica y la radioterapia se están utilizando cada vez más, sobre todo en los meningiomas inaccesibles, recurrentes o extirpados de forma subtotal, particularmente si son malignos o anaplásicos. Sin embargo, en algunos pacientes la decisión terapéutica puede ser difícil debido a la ausencia de síntomas o los riesgos de la intervención (Lusis and Gutmann 2004).

1.1.3. CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO

Los factores más importantes que determinan la recurrencia de los meningiomas son la extensión de la resección tumoral y el grado histológico. La clasificación histopatológica de los meningiomas ha sido revisada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2000 y más recientemente en el año 2007 (Tabla 1.1), e incluye hallazgos genéticos además de características patológicas e inmunohistoquímicas y propone un sistema de grados tumorales basado en correlaciones clínico-patológicas estadísticamente significativas (Louis et al. 2000a; Louis et al. 2007).

Tabla 1.1.

CLASIFICACIÓN DE MENINGIOMAS POR LA OMS (2007)	GRADO
Meningiomas con bajo riesgo de recurrencia y/o crecimiento agresivo	
Meningoendotelial	GI
Fibroso/fibroblástico	GI
Transicional (mixto)	GI
Psamomatoso	GI
Angiomatoso	GI
Microquístico	GI
Secretor	GI
Linfoplasmocítico	GI
Metaplásico	GI
Meningiomas con alto riesgo de recurrencia y/o crecimiento agresivo	
Atípico	GII
De células claras (intracraneal)	GII
Cordoide	GII
Rabdoide	GIII
Papilar	GIII
Anaplásico (maligno)	GIII
Además: Meningiomas de cualquier subtipo o grado con un alto índice de proliferación y/o invasión cerebral	

En esta clasificación, ninguna de las aberraciones genéticas típicas ha adquirido una relevancia clínica para los meningiomas. Sin embargo, el análisis de estas aberraciones en relación con el grado histológico ha llevado a un modelo en el cual alteraciones tempranas, que están presumiblemente involucradas en la formación de meningiomas, pueden ser distinguidas de alteraciones posteriores que están asociadas con progresión tumoral. (Figura 1.1.)

PROGRESIÓN TUMORAL EN MENINGIOMAS

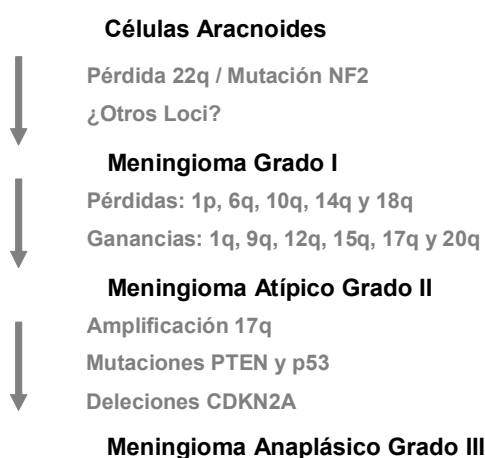


Figura 1.1. Alteraciones asociadas con progresión tumoral en meningiomas.

La mayoría de los meningiomas (80%) son benignos —OMS grado I (GI)—. Los subtipos histopatológicos en esta categoría incluyen: meningiomas meningoteliales, fibrosos y transicionales como las variantes más frecuentes. Menos comunes son los meningiomas psamomatoso, angiomatoso, secretor, microquístico y metaplásico. El grado GI presenta un relativo bajo riesgo tanto de recurrencia (7-20%) como de comportamiento agresivo, dependiendo de la localización.

Entre el 5% y el 15% de los meningiomas son clasificados como atípicos —OMS grado II (GII)—. Se caracterizan por una actividad mitótica incrementada (≥ 4 mitosis/ 10 campos de alta resolución de 0.16mm²) o tres o más de las siguientes características: celularidad incrementada, células pequeñas con alta proporción núcleo/citoplasma, nucleolo prominente y necrosis. Esto se correlaciona con tasas de recurrencia más elevadas (30-40%). Los meningiomas cordoides y de células claras son también clasificados como GII.

Los meningiomas anaplásicos (malignos) —OMS grado III (GIII)— son raros (1-3%) y muestran una citología maligna obvia y altos índices mitóticos (≥ 20 mitosis/10 campos). Los GIII tienen tasas de recurrencia de 50% a 80% y, por lo general, conducen a la muerte en los dos años siguientes al diagnóstico (Louis et al. 2000b; Riemenschneider, Perry, and Reifenberger 2006).

1.1.4. GENÉTICA DE LOS MENINGIOMAS

Citogenéticamente, los meningiomas son una de las neoplasias mejor estudiadas en humanos. En 1967 se describió la primera monosomía de un cromosoma del grupo G en un tumor de meninge (Zang and Singer 1967), y su identificación como cromosoma 22, con una alta frecuencia de monosomía (70%) fue descrita en 1972 (Zankl and Zang 1972). Otros cambios citogenéticos asociados a la progresión tumoral incluyen principalmente las deleciones de 1p y 14q (Rey et al. 1988). Estudios moleculares han demostrado que aproximadamente la mitad de estos tumores tienen pérdidas alélicas que incluyen la banda q12 del cromosoma 22. Además, los meningiomas atípicos muestran frecuentemente pérdidas alélicas en 1p, 6q, 10, 14q, y 18q y ganancias en 1q, 9q, 12q, 15q, 17q y 20q. Los meningiomas anaplásicos, además de compartir estas alteraciones, muestran con mayor frecuencia pérdidas de 6q, 10 y 14q así como ganancias y/o amplificaciones en 17q23 (Buschges et al. 2002; Leone et al. 1999; Louis et al. 2000b; Weber et al. 1997).

Molecularmente, se considera al gen *NF2* como candidato importante en la génesis de los meningiomas, ya que sus mutaciones representan la alteración más frecuente en este tipo de neoplasia. Dichas mutaciones se han detectado hasta en un 60% de los meningiomas estudiados (Louis et al. 2000b) y están típicamente asociadas con la pérdida de heterocigosidad (LOH: pérdida de un alelo en un locus constitucional heterocigoto) de la región 22q, observada en un 40-70% de todos los meningiomas (Louis et al. 2000b). El gen *NF2* puede presentar también silenciamiento por hipermetilación aberrante de las islas CpG de su región promotora (Lomas et al. 2005), aunque no ha sido encontrada en todos los estudios realizados (van Tilborg et al. 2006).

1.1.4.1. GEN *NF2*

En 1993 dos grupos independientes identificaron el gen responsable de la neurofibromatosis tipo II (Rouleau et al. 1993b; Trofatter et al. 1993). Estos autores sugirieron que se trataba de un gen supresor de tumores alterado tanto en ADN de familias con el síndrome NF2, como en meningiomas de pacientes sin relación con este síndrome hereditario. El uso combinado de estudios de ligamiento y de mapas de delección tumoral había localizado previamente el gen *NF2* en la región cromosómica 22q12.2 (Arai et al. 1992; Rouleau et al. 1990; Wertelecki et al. 1988; Wolff et al. 1992). (Figura 1.2.). El gen está compuesto por 17 exones y presenta una gran semejanza (45-47%) con varios miembros de la familia de proteínas 4.1. El producto del gen *NF2* es conocido como **merlin** (Trofatter et al. 1993) o schwannomin (Rouleau et al. 1993a).

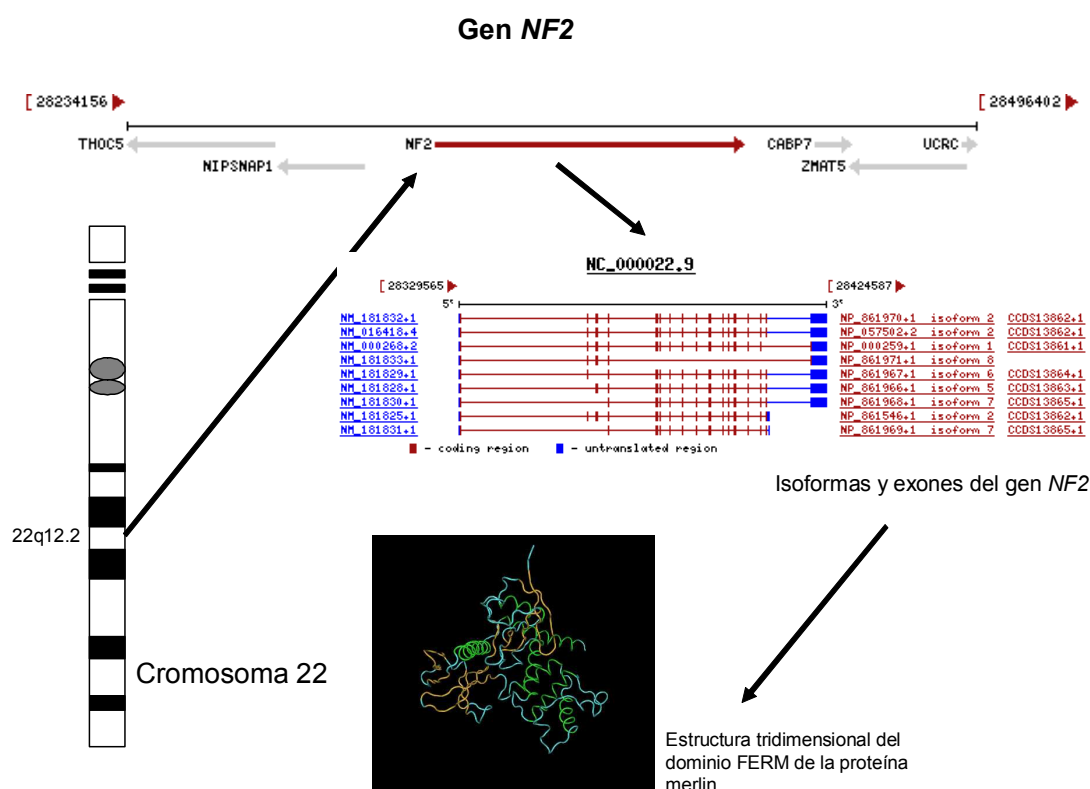


Figura 1.2. El gen *NF2* está localizado en la región 22q12.2, está compuesto de 17 exones y presenta 9 variantes alternativas de ARNm.

Merlin pertenece a la familia de proteínas estructurales 4.1 que conectan el citoesqueleto a proteínas integrales de la membrana citoplasmática (Gusella et al. 1999). La sobreexpresión de esta proteína puede

inhibir tanto la proliferación celular, regulando negativamente los niveles de ciclina D1, como la transformación inducida por oncogenes (Tikoo et al. 1994; Lutchman and Rouleau 1995; Xiao et al. 2002).

Por otro lado, la interacción de merlin con la porción intra-citoplasmática de CD44 modifica la regulación de la inhibición por contacto de la proliferación y motilidad celular (Morrison et al. 2001). Sin embargo, ya que se localiza predominantemente en la interfase membrana-citoesqueleto, probablemente no tenga un control directo del ciclo celular sino que, como las demás proteínas 4.1, podría crear un puente regulador entre las proteínas asociadas a la membrana y el citoesqueleto de actina. Esta característica le permite actuar como un supresor de tumor que recibe e interpreta señales provenientes del medio extracelular, coordinando vías como las de señalización del receptor de factor de crecimiento o de adhesión celular (McClatchey and Giovannini 2005), entre otras.

La mayoría de las mutaciones que se producen en este gen son pequeñas inserciones, deleciones o mutaciones sin sentido cuyo resultado es una proteína truncada y/o no funcional (Kleihues et al. 2002). En gran parte de los meningiomas estudiados se ha encontrado una inmunoreactividad ausente o fuertemente reducida para la proteína merlin. Además, este hecho está fuertemente asociado con LOH de 22q (Hitotsumatsu et al. 1997). Recientemente se está utilizando una técnica de amplificación dependiente de ligasa para múltiples sondas (MLPA), con la que se pueden detectar grandes deleciones y duplicaciones. Esta metodología, que puede discriminar entre pérdidas presentes de forma simultánea en los dos alelos del gen, y que frecuentemente escapan a otros métodos de análisis, encontró una frecuencia de hasta 74% de grandes alteraciones (deleciones o duplicaciones) en el gen *NF2* para este tipo tumoral (Martinez-Glez et al. 2007; Kluwe et al. 2005).

La frecuencia de alteraciones en *NF2*/merlin difiere entre las tres variantes de meningioma benigno más comunes. Mientras que los meningiomas fibroblásticos y transicionales muestran mutaciones de *NF2* en aproximadamente un 70-80% de los casos, los meningoteliales tienen mutaciones en un 25% (Wellenreuther et al. 1995). Esta menor frecuencia de alteraciones en la variante meningotelial sugiere un origen genético diferente a las alteraciones en el gen *NF2*.

Por otra parte, la expresión reducida de merlin es frecuente en la mayoría de los meningiomas fibroblásticos y transicionales, pero rara en los tumores meningoteliales (Evans et al. 2001; Hitotsumatsu et al. 1997). Además, la frecuencia similar de mutaciones de *NF2* en meningiomas atípicos y anaplásicos, así como en fibroblásticos y transicionales sugiere que las mutaciones de *NF2* no están involucradas en la progresión hacia meningiomas de mayor grado. Por el contrario, las mutaciones en este gen parecen representar una alteración temprana que podría estar involucrada en la formación de la mayoría de los meningiomas benignos (Lamszus 2004).

1.1.4.2. OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA 4.1

La familia de proteínas estructurales 4.1 (proteínas asociadas a membrana) incluye el producto del gen *NF2* (merlin) y las proteínas ezrin, radixin y moesin, quienes contribuyen de forma significativa a la interacción entre las glicoproteínas de la superficie celular y el citoesqueleto de actina (Tsukita et al. 1994). Recientemente se ha identificado un nuevo miembro de esta familia, *DAL-1/4.1B* (*Differentially expressed in Adenocarcinoma of the Lung*), que comparte un 73% de homología con el dominio N-Terminal de las proteínas estructurales 4.1. También conocido como *EPB41L3*, y localizado en 18p11.3, este gen se expresa generalmente a altos niveles en cerebro y a bajos niveles en riñón, intestino y testículos (Tran et al. 1999). Mediante técnicas de LOH, RT-PCR, Western Blot y análisis inmunohistoquímicos, se ha observado pérdida de *DAL-1/4.1B* en un 60% de meningiomas esporádicos, siendo un evento temprano del proceso tumorigénico, y sugiriendo que la proteína podría ser un regulador crítico del crecimiento tumoral en la patogénesis de la transformación neoplásica (Gutmann et al. 2000). En este sentido, análisis adicionales han mostrado que *DAL-1/4.1B* suprime el crecimiento y proliferación celular en meningiomas (Robb et al. 2005; Charboneau et al. 2002; Gutmann et al. 2001).

Sin embargo, el análisis mutacional de *DAL-1/4.1B* en una serie de 83 meningiomas, identificó alteraciones en sólo 3 muestras (Martinez-Glez et al. 2005), lo que descarta que las variaciones de secuencia de este gen sean el principal mecanismo por el que *DAL-1/4.1B* participa en la transformación neoplásica, sugiriendo mecanismos de inactivación alternativos como podría ser el silenciamiento por cambios epigenéticos.

Por otra parte, el gen *DAL-1/4.1B* interactúa con el gen *TSLC1* (*Tumour Suppressor in Lung Cancer-1*), cuya pérdida de expresión en meningiomas se correlaciona con un incremento del grado de malignidad y una reducción de la supervivencia de los pacientes, sugiriendo un papel activo en el control del ciclo de crecimiento celular (Surace et al. 2004). Otros datos posteriores sugieren que *DAL-1/4.1B* también actúa como gen supresor al activar la señalización de c-Jun-NH₂-kinasa (JNK) dependiente de Rac-1 (Gerber, Bahr, and Gutmann 2006). JNK regula el crecimiento celular e integra señales provenientes de múltiples estímulos que involucran tanto las vías de apoptosis como de control del ciclo celular (Weston and Davis 2002).

Otro miembro de la familia de proteínas asociadas a membrana es la proteína 4.1R, que muestra también bajos niveles de expresión en meningiomas e inhibe el crecimiento *in vitro* de células de meningioma (Robb et al. 2003). Esta proteína está codificada por el gen *EPB41* (*erythrocyte membrane protein band 4.1*), localizado en 1p33-p32, región frecuentemente perdida en meningiomas. Por lo tanto, la transformación neoplásica y la progresión de este tipo tumoral podrían estar estrechamente asociadas a la inactivación de uno o más miembros de la familia de proteínas 4.1.

1.1.4.3. OTROS GENES EN EL CROMOSOMA 22

NF2 es sin duda el gen localizado en 22q más frecuentemente alterado en meningiomas y probablemente el gen supresor de tumor (GST) más importante de esa región. Sin embargo, la frecuencia de mutaciones en este gen es menor que la LOH del cromosoma 22 identificada en esta neoplasia. Además, se han encontrado meningiomas con deleciones intersticiales del cromosoma 22 que no incluyen a *NF2* (Ruttledge et al. 1994). En un paciente con meningiomas múltiples, se ha descrito la pérdida de una copia del cromosoma 22 en ausencia de mutaciones del gen *NF2* (Lomas et al. 2002), lo que sugiere la participación de otro(s) GST, localizados en el cromosoma 22, en la patogénesis de los meningiomas.

De acuerdo con esta hipótesis, varios candidatos han sido propuestos: *AP1B1* (*adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit*) es un miembro de la familia de genes β -adaptin humano, que se encarga de mediar tanto el reclutamiento de clatrina para las vesículas del aparato de Golgi, como el reconocimiento de

señales en las porciones citosólicas de los receptores transmembrana. Este gen, localizado en 22q12.2 y muy próximo al gen *NF2*, ha sido clonado gracias a la identificación de una delección en homocigosis en un meningioma esporádico, y se ha observado que se encuentra inactivado en un 13% de meningiomas (Peyrard et al. 1994), aunque no se encontraron mutaciones en este gen en una serie de 110 meningiomas, lo que sugiere mecanismos epigenéticos de inactivación (Peyrard et al. 1996).

Otro candidato es el gen *MN1* (*meningioma —disrupted in balanced translocation— 1*), que se encuentra localizado en la región 22q12.1 y también está asociado a meningiomas (Lekanne Deprez et al. 1995). Sin embargo, parece que actúa como un co-activador de la transcripción oncogénica más que como un supresor de tumor.

El gen *SMARCB1* (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1*), localizado en 22q11.23, está frecuentemente mutado en tumores rabdoides malignos. Este gen podría funcionar en asociación con el gen *NF2*, ya que en un estudio se detectó una misma mutación en 4 de 126 meningiomas, presentando además mutaciones en *NF2* en tres de ellos (Schmitz et al. 2001).

La expresión del gen *CLTCL1* (*clathrin, heavy chain-like 1*), localizado en 22q11.21, no se detectó en un 80% de meningiomas analizados, sugiriendo que este gen puede ser relevante para el desarrollo tumoral. Dentro del grupo de tumores con ausencia de expresión se encontraron casos con y sin delecciones del cromosoma 22. Sin embargo, no se han descrito mutaciones del gen *CLTCL1/CLH-22*, ni tampoco se ha definido aún el mecanismo que origina la pérdida de su expresión (Kedra et al. 1996).

Finalmente, el gen *LARGE* (*like-glycosyltransferase*), localizado en 22q12.3, podría estar involucrado en reordenamientos genómicos asociados a tumores. Es otro candidato interesante, aunque es uno de los genes humanos más grandes y precisa de mayores análisis mutacionales y de expresión (Peyrard et al. 1999).

1.1.4.4. OTROS GENES Y REGIONES CROMOSÓMICAS

La segunda anomalía cromosómica más frecuente en meningiomas es la pérdida de 1p, cuya frecuencia se incrementa con el grado tumoral y está asociada con progresión (Bello et al. 1994). Las dos localizaciones principalmente involucradas incluyen las regiones 1p36 y 1p33-34. En esta última se ha reducido hasta 2.8 mega bases (Mb) la región mínima de deleciones comunes, lo que identifica un *locus* supresor de tumores donde se encuentran genes candidatos como *MUTYH*, *PRDX1*, *FOXD2*, *FOXE3*, *PTCH2* y *RAD54L* (Sulman, White, and Brodeur 2004). En 1p36 se ha delimitado la zona hasta una región de 8.21 Mb (Murakami et al. 2003). Muchos genes candidatos en 1p han sido analizados para determinar mutaciones asociadas a meningiomas, incluyendo *CDKN2C* (p18^{ink4}), *TP73*, *RAD54L* y *ALPL* (Bostrom et al. 2001; Lomas et al. 2004; Mendiola et al. 1999; Muller et al. 1999).

En el gen *RAD54L* (*RAD54-like* —*S. cerevisiae*—) se ha observado un polimorfismo silente en el nucleótido 2290 que podría estar asociado con una mayor frecuencia de desarrollo de meningiomas (Leone et al. 2003). Por otra parte, el gen *TP73* (*tumor protein p73*) presenta una expresión incrementada según avanza el grado tumoral, sugiriendo una posible función oncogénica dominante más que una función clásica de supresión tumoral. Sin embargo, en ninguno de estos genes se han encontrado alteraciones estructurales constantes que los vinculen claramente con la patogénesis o progresión de meningiomas, condición que puede extrapolarse a otro tipo de neoplasias como los oligodendrogliomas o neuroblastomas. Una posible explicación a la falta de alteraciones estructurales, podría ser el silenciamiento génico por metilación de islas CpG, ya que se ha observado niveles aumentados de hipermetilación aberrante de promotores génicos en tumores de meninge con pérdidas de 1p, incluido el gen *TP73* (Lomas et al. 2004; Bello et al. 2004).

Después de la pérdida de 1p, la siguiente alteración citogenética más frecuente es la pérdida del brazo largo del cromosoma 14 (Menon et al. 1997; Tse et al. 1997; Leone et al. 1999). Esta alteración parece ser importante, ya que las pérdidas de 14q aumentan su frecuencia de forma paralela al incremento del grado tumoral. Diversos estudios han descrito una región mínima de deleciones comunes en regiones que abarcan desde 14q21 hasta 14q32 (Menon et al. 1997; Tse et al. 1997; Weber et al. 1997; Leone et al.

1999). Esta falta de concordancia en las regiones coincide con el hecho de que no se ha identificado un GST candidato en 14q que pueda explicar de forma estable la patogénesis de los meningiomas.

El gen *NDRG2* (*NDRG family member 2*), localizado en 14q11.2, ha mostrado una disminución en su expresión a nivel transcripcional y proteico en meningiomas anaplásicos y en meningiomas atípicos de comportamiento agresivo, por lo que podría asociarse a progresión tumoral de meningiomas. Dicha disminución de expresión está estrechamente asociada a la hipermetilación aberrante de la región promotora del gen *NDRG2* (Lusis et al. 2005), lo que le confiere importantes cualidades como posible biomarcador en la predicción de la agresividad tumoral.

Otro evento citogenético frecuente en meningiomas, especialmente en los de alto grado, es la pérdida del cromosoma 10, principalmente del brazo largo. En la actualidad no se ha identificado todavía ningún GST en el cromosoma 10 que muestre altos porcentajes de alteraciones mutacionales o inactivación en meningiomas. El gen *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog —mutated in multiple advanced cancers 1—*) es un conocido supresor de tumores con altas frecuencias mutacionales en una amplia variedad de tipos tumorales y, dada su localización en 10q23.3, este gen ha sido ampliamente estudiado en meningiomas, aunque no se ha encontrado una frecuencia significativa de mutaciones, ni tampoco deleciones en homocigosis (Bostrom et al. 1998; Peters et al. 1998).

Una situación similar podemos observar en el cromosoma 17, donde estudios de hibridación genómica comparada (CGH) han mostrado amplificación en la región 17q en meningiomas anaplásicos (Weber et al. 1997), pero no se ha identificado hasta la fecha un GST candidato para esta región. El gen *TP53* (*tumor protein p53 —Li-Fraumeni syndrome—*), localizado en 17p13.1, es uno de los genes más frecuentemente mutados en la mayor parte de los carcinomas, pero no lo está en los meningiomas, donde se han encontrado escasas mutaciones y poca o ninguna correspondencia con los grados histológicos.

Por otra parte, en los meningiomas anaplásicos es frecuente (32%) ver pérdidas del cromosoma 9 (Weber et al. 1997), en cuyo brazo corto se encuentran los genes supresores de tumor *CDKN2A* (9p21) y

CDKN2B (9p21), que en muchas ocasiones están inactivados por mutación y/o delección en una amplia variedad de tumores. El producto del gen *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) secuestra la proteína Mdm2, que es responsable de la degradación de p53; por lo tanto, su efecto es estabilizar a p53. A pesar de la ausencia de mutaciones de *TP53* en meningiomas, los hallazgos mutacionales y de silenciamiento por metilación del promotor de *CDKN2A* podrían explicar la inactivación de p53 mediada por Mdm2, contribuyendo así a la progresión tumoral de los meningiomas (Amatya, Takeshima, and Inai 2004). *CDKN2B* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*) se encarga de inhibir la activación de las kinasas CDK y, por lo tanto, es un regulador del crecimiento celular controlando la progresión de la fase G1 del ciclo celular a través del control transcripcional y fosforilación de la proteína codificada por el gen del retinoblastoma (*RB1*).

Algunos otros genes han sido relacionados con la patogénesis o progresión en meningiomas. Así, el gen *TGF- β* (*transforming growth factor, beta*) podría actuar como inhibidor, y la somatostatina modularía, el crecimiento celular de meningiomas *in vitro* (Arena et al. 2004; Johnson, Okediji, and Woodard 2004). Además, el factor de permeabilidad vascular *VEGF-A* (*vascular endothelial growth factor A*), es un importante regulador de la angiogénesis y de la formación de edema, correlacionándose su expresión con vascularidad y recurrencia en los meningiomas (Yamasaki et al. 2000; Provias et al. 1997).

La telomerasa (*hTERT*) es una enzima relacionada con el mantenimiento de la longitud de los telómeros que se inactiva en la mayoría de los tejidos adultos. Esta enzima ha mostrado niveles elevados de actividad, así como de expresión de su ARN mensajero, hasta en un 100% de los meningiomas GIII. Por lo tanto, podría estar implicada en progresión tumoral (Boldrini et al. 2003). Además, *hTERT* podría servir en la predicción de recurrencia ya que su activación se correlaciona con una evolución libre de progresión tumoral más corta (Maes et al. 2005).

Las metaloproteinasas de la matriz codificadas por los genes *MMP2* (*matrix metalloproteinase 2*) y *MMP9* (*matrix metalloproteinase 9*), tienen la capacidad de degradar los elementos de la membrana basal, pudiendo conferir así a las células tumorales de los meningiomas un potencial invasor hacia el cerebro o la

duramadre. Estas proteínas se expresan en el 100% de los meningiomas, pero sus niveles se incrementan al aumentar el grado tumoral. Un inhibidor de estas metaloproteinasas es *TIMP-1* (*TIMP metalloproteinase inhibitor 1*), el cual se expresa en la mayoría de los meningiomas y tiene la capacidad de promover la proliferación celular y actuar como anti-apoptótico. Las alteraciones en el balance de expresión de estos genes podrían explicar, en parte, los procesos de invasión y recurrencia en meningiomas (Okada et al. 2004; Das, Tan, and Smith 2003).

Las alteraciones epigenéticas, es decir, aquellas que afectan a la expresión génica en ausencia de cambios en la secuencia del ADN, parecen jugar un papel importante en la tumorigénesis de muchos tipos de neoplasias, incluidos los meningiomas. Además, estas alteraciones parecen presentarse como un evento temprano en la progresión tumoral (Esteller 2002). El silenciamiento génico por hipermetilación aberrante de los dinucleótidos CpG de las regiones promotoras de varios genes supresores de tumor ha sido descrito en meningiomas.

Se ha descrito hipermetilación aberrante de la región promotora del gen *NF2* en un 26% de las muestras de una serie de 88 meningiomas. Además, en 15 de los tumores estudiados, en su mayoría de grado I, la hipermetilación aberrante fue la única alteración detectada (Lomas et al. 2005). En otro estudio realizado en una serie de 98 meningiomas, se detectó hipermetilación en frecuencias importantes para los genes supresores de tumor *THBS1* (30%), *TIMP-3* (24%), *p16(INK4a)* (17%), *MGMT* (16%), *p73* (15%), *ER* (15%), y *p14(ARF)* (13%), mostrando además una relación entre incremento de muestras metiladas y pérdida alélica de 1p aislada o en concurrencia con pérdida de 22q (Bello et al. 2004). Otro estudio, realizado en una serie de 48 meningiomas atípicos y anaplásicos, encontró hipermetilación en la región promotora de los genes *GSTP1* (27%), *THBS1* (15%), *RB1* (10%), *CDKN2A* (10%), *MGMT* (6%), *DAPK1* (4%), *VHL* (4%) y *CDKN2B* (4%); no se encontró hipermetilación para el gen *TIMP3* (Liu et al. 2005). Estos hallazgos indican que el silenciamiento por hipermetilación aberrante de los promotores génicos contribuye a la génesis y progresión tumoral de los meningiomas.

En algunos tipos tumorales se ha asociado el polimorfismo C677T, en el gen MTHFR (*5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)*), con un mayor riesgo de cáncer. Este gen produce una enzima involucrada en el metabolismo del folato y tiene un importante papel en la síntesis, metilación y reparación del ADN en células con división celular activa (Powers 2005). Aunque este polimorfismo no ha podido ser detectado en un estudio realizado en meningiomas (Kafadar et al. 2006), recientemente ha aumentado el interés por este cambio de un solo nucleótido (SNP), debido a que la actividad disminuida de la enzima resultante y una consecuente disponibilidad reducida de grupos metilo, necesarios para los mecanismos de metilación, podría ofrecer nuevas perspectivas de investigación en tumores con probadas alteraciones epigenéticas.

1.2. SCHWANNOMAS

Los schwannomas están estrechamente vinculados a los meningiomas debido a su coexistencia, especialmente en la neurofibromatosis tipo II (NF2) y con menor frecuencia en los tipos I y III. Además, comparten como principal aberración genética las alteraciones en el gen *NF2*, tanto en los casos esporádicos como en los que muestran agregación familiar.

1.2.1. INCIDENCIA, PRESENTACIÓN Y ETIOLOGÍA

Los schwannomas (o neurilemomas) son neoplasias benignas derivadas de las células de Schwann y, junto con el neurofibroma, constituyen uno de los 2 tipos tumorales periféricos benignos más comunes de la vaina de los nervios. Además de su forma esporádica, los schwannomas se presentan asociados al síndrome NF2, el cual muestra un patrón de herencia autosómico dominante y una alta penetrancia. En esta entidad la lesión tumoral característica son los schwannomas vestibulares bilaterales, que pueden ir acompañados de meningiomas, ependimomas, schwannomas espinales y opacidad presenil de cristalino.

Otra forma de neurofibromatosis, no asociada al síndrome NF2 y recientemente reconocida, es la schwannomatosis. Esta patología muestra lesiones múltiples que rara vez son vestibulares y representa

2.4%-5% de los pacientes que requieren extirpación quirúrgica de schwannomas (MacCollin et al. 2005). La schwannomatosis es tan frecuente como la NF2, pero su presentación familiar es poco habitual (MacCollin et al. 2005). Los schwannomas pueden también encontrarse en los infrecuentes síndromes de neoplasias múltiples como el Complejo de Carney (Boikos and Stratakis 2006).

Los schwannomas pueden afectar a cualquier localización del sistema nervioso periférico (nervios craneales y periféricos) y se originan dentro de un nervio compuesto de un solo fascículo. Estos tumores se componen enteramente de las células de Schwann de soporte y de las fibras nerviosas periféricamente desplazadas, dando por resultado una masa tumoral excéntrica, generalmente solitaria, encapsulada y de menos de 10 cm. de diámetro. Los tumores esporádicos se presentan como media a los 50 años de edad (Ferner and O'Doherty 2002; Neff et al. 2006).

Los schwannomas vestibulares —también conocidos como neuromas del acústico— son tumores histológicamente benignos, que se originan en las ramas vestibulares del VIII nervio craneal y se presentan tanto de forma esporádica unilateral como bilateral. La presentación bilateral de tipo familiar es la característica principal de la NF2 (Neff et al. 2006). Los schwannomas vestibulares representan la gran mayoría de los tumores encontrados en el ángulo cerebelopontino, el resto la componen principalmente los meningiomas. Estos tumores son clínicamente detectados en 0.7 a 1 individuo por cada 100 000 habitantes (Evans et al. 2005; Howitz et al. 2000). Esta cifra se incrementa si se incluyen los tumores encontrados retrospectivamente en resonancias magnéticas de pacientes sin sospecha previa de este tipo de tumores (Anderson et al. 2000) o en autopsias (Schneider et al. 1983).

Los schwannomas vestibulares pueden agruparse en esporádicos unilaterales (95%), bilaterales (5%) —asociados al síndrome NF2— y en schwannomas quísticos (<1%) (Howitz et al. 2000). Aproximadamente la mitad de los casos asociados a NF2 se presentan sin historia familiar previa de neurofibromatosis y, por lo tanto, representan mutaciones germinales *de novo*, o pueden representar casos de pérdidas o mutaciones del gen NF2 en forma de mosaicismo (Anderson et al. 2000). Los schwannomas

vestibulares de tipo quístico son un grupo agresivo, con alto grado de atipia nuclear y rápido crecimiento, lo que a veces complica su tratamiento.

La pérdida auditiva unilateral es la característica principal en los pacientes afectados por schwannomas vestibulares y se puede producir tanto por lesión directa del nervio coclear, como por la interrupción del aporte sanguíneo a este nervio. Los síntomas que acompañan esta pérdida auditiva incluyen tinnitus, vértigo, desequilibrio y menos frecuentemente cefalea y entumecimiento y/o debilidad facial (Hanemann and Evans 2006). De manera menos frecuente, los tumores que alcanzan grandes tamaños pueden producir hidrocefalia (Rogg et al. 2005), con la consiguiente compresión y herniación cerebral, pudiendo causar la muerte.

El estudio diagnóstico definitivo para los tumores acústicos es la resonancia magnética con marcaje de gadolinio, que puede detectar masas de hasta 1-2 cm. de diámetro. El tratamiento posterior depende de las características de la masa tumoral y del paciente, abarcando desde la simple observación hasta la intervención micro-quirúrgica o la radiocirugía estereotáctica, aunque la extirpación quirúrgica sigue siendo el tratamiento de elección para la erradicación del tumor (Mehta et al. 2006).

1.2.2. CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO

La clasificación histopatológica de los schwannomas revisada por la OMS en el año 2007 incluye los subtipos celular, plexiforme y melanótico (Louis et al. 2007). Histológicamente, la principal característica de los schwannomas es la alternancia de áreas con patrones Antoni tipo A y B. El tipo A se caracteriza por la presencia de masas firmes de células onduladas rodeadas por una trama reticular. El tipo B se caracteriza por células alargadas en un patrón menos denso, rodeadas por una trama de colágeno.

Los schwannomas suelen comportarse de manera benigna y las resecciones incompletas pueden presentar una recurrencia lenta. Sin embargo, frecuencias más altas de recurrencia se asocian con los schwannomas intraespinales, sacros e intracraneales y, especialmente con la variedad plexiforme. Localmente, el comportamiento agresivo se observa en tumores con celularidad incrementada, tasas

mitóticas altas (>4 por 10 campos de alta resolución) y extensión al hueso subyacente. Los pacientes con schwannomas asintomáticos asociados a NF2 no sólo tienen déficit neurológico más severo sino que también sufren una menor recuperación post-operatoria y un índice más alto de recurrencia. Aún así, la malignización de los schwannomas es extremadamente rara.

Existen diferencias clínicas y patológicas entre los schwannomas vestibulares bilaterales asociados a NF2 y los esporádicos unilaterales. Los primeros se presentan en una edad más temprana, son lobulados, menos vasculares y tienen un índice más alto de proliferación que los encontrados en casos esporádicos (Sobel 1993). Las tasas de crecimiento de tumores esporádicos y asociados a NF2 son altamente variables (Baser, Makariou, and Parry 2002). Existen evidencias recientes que sugieren que el índice de crecimiento de schwannomas vestibulares asociados a NF2 disminuye al aumentar la edad de los individuos, no siendo este hecho dependiente de la mutación constitucional en el gen *NF2*. La frecuencia de estos tumores es altamente variable dentro de las familias y no se relaciona con el número de tumores espinales u otros tipos tumorales cerebrales, ni con la severidad total de la enfermedad (Mautner et al. 2002; Baser, Makariou, and Parry 2002).

1.2.3. GENÉTICA DE SCHWANNOMAS

La única característica genética común y constante de los schwannomas, sea cual sea su localización, es la pérdida de parte del cromosoma 22, que puede ser encontrada hasta en un 50% de estos tumores. Esta pérdida incluye la región 22q12, que alberga el gen *NF2*, en la mayoría pero no todos los casos (Bruder et al. 1999). Además, las mutaciones inactivantes de este gen se han encontrado hasta en un 60% de los shwannomas esporádicos. Si, además de la pérdida de dicha región, sumamos que las alteraciones citogenéticas y moleculares encontradas hasta la fecha en otros cromosomas son muy dispersas y probablemente aleatorias (Antinheimo et al. 2000), podemos plantear como hipótesis no sólo que debe haber otros genes implicados en la patogénesis de este tipo de neoplasias espinales esporádicas, sino que es posible que alguno de ellos se encuentre en el brazo largo del cromosoma 22, en un *locus* diferente al del gen *NF2*.

La LOH del cromosoma 22, que se produce más frecuentemente en las lesiones vestibulares que en las espinales, muestra una concordancia con la actividad proliferativa neoplásica de los schwannomas. También hay estudios que resaltan una correlación genotipo-fenotipo con el gen *NF2*, de ello puede inferirse que las mutaciones sin sentido y de cambio del marco de lectura podrían asociarse a fenotipos más severos, mientras que las mutaciones de pérdida del sentido y las grandes deleciones génicas de *NF2* producirían manifestaciones más leves (Patronas et al. 2001). Sin embargo, estas apreciaciones parecen ser más válidas para los tumores asociados familiarmente a la neurofibromatosis que para los que surgen como casos esporádicos (Baser et al. 2004).

Otro factor que influye en la severidad de la presentación de los schwannomas asociados a *NF2* es el mosaicismo, que puede ser detectado *de novo* en un 25%-30% de los pacientes, y cuya manifestación clínica es menos severa. Los descendientes de pacientes con mosaicismo que hereden la mutación presentarán, por el contrario, una clínica más severa al portar el defecto en todas sus células (Moyhuddin et al. 2003; Kluwe et al. 2003).

Debido a que la principal característica genética encontrada en los schwannomas es la alteración del gen *NF2*, los avances moleculares en este tipo tumoral van paralelos al estudio de los meningiomas. En este sentido, algunos estudios sugieren que la proteína merlin puede regular la activación de los receptores tirosín-kinasa, convirtiéndolos en importantes dianas terapéuticas en varios tipos tumorales, incluidos los meningiomas y schwannomas (Dancey and Sausville 2003).

Es evidente que no existe una vía de señalización única y específica a la que pueda atribuirse la patogénesis de los schwannomas. Sin embargo, algunas investigaciones han aportado datos relevantes, como es el análisis de diferentes rutas que muestran que el más potente mediador de la angiogénesis y conocido mitógeno celular, el gen *VEGF*, parece estar directamente involucrado en el patrón de crecimiento de los schwannomas vestibulares (Caye-Thomasen et al. 2005).

En cuanto a la vía de señalización Rac1/JNK, estudios en schwannomas que no expresan la proteína merlin han mostrado actividades incrementadas de *RAC1* (*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* —*rho family, small GTP binding protein Rac1*—) y de su efector *PAK1* (*p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1*), así como de *MAPK8* (*mitogen-activated protein kinase 8*; *JNK1*) y *MAPK9* (*mitogen-activated protein kinase 9*; *JNK2*), lo que sugiere que merlin podría regular la activación de Rac proporcionándole a ésta un papel importante en la diferenciación celular (Kaempchen et al. 2003). Además, se conoce que la fosforilación de merlin regula su actividad supresora de tumor. La proteína Cdc42-Pak y la proteína paxillin son las encargadas de fosforilar la serina 518 de la proteína merlin; ésto produce una falta de la actividad antiproliferativa de merlin en células de Schwann (Thaxton et al. 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que los schwannomas vestibulares producen el factor de crecimiento glial neuregulin-1 (*NRG1*) y sus receptores ErbB2 (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog*) y ErbB3 (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*), cuya inhibición disminuye la proliferación de células de schwannoma vestibular *in vitro*, y por lo tanto podría tener un posible papel terapéutico (Hansen et al. 2006).

Otras alteraciones genéticas encontradas en schwannomas incluyen: pérdidas de las regiones cromosómicas 1p, 7p, 13q, 15q, 16q, 19p, 20q, 21q y Xq, así como ganancias en las regiones 11q, 17q y cromosomas 5, 7, 19 y 20 (Antinheimo et al. 2000; Warren et al. 2003). Estudios adicionales de LOH realizados en regiones cromosómicas específicas que incluyen conocidos genes supresores de tumor —VHL (3p25-26) y TP53 (17p13.1)—, tampoco han mostrado ser informativos (Irving et al. 1993).

Otro fenómeno que también ha sido estudiado en schwannomas, y que pertenece al ámbito de la epigenética, es la hipermetilación de promotores génicos, observándose frecuencias importantes en genes conocidos por su implicación en diversos tipos tumorales. La clonación y caracterización funcional de la región promotora del gen *NF2*, permitió identificar, en 14 de 23 schwannomas vestibulares, tres sitios CpG cuya metilación provoca una disminución de la actividad de la región promotora de este gen (Kino et al. 2001). En otro estudio realizado en 44 schwannomas, tanto esporádicos como asociados a *NF2*, se

detectó hipermetilación de promotores para los genes *THBS1* (36%), *TP73* (27%), *MGMT* (20%), *NF2* (18%), *TIMP-3* (18%), *RB1/p16^{INK4a}* (15%) (Gonzalez-Gomez et al. 2003). Además, en un trabajo posterior, hemos observado porcentajes importantes de metilación para los genes *THBS1* (30%), *bMLH1* (21%), *TP73* (19%), *TIMP3* (17%) y *MGMT* (16%), en una serie de 88 schwannomas (Bello et al. 2007).

Otros trabajos, han mostrado una correlación clínico-radiológica con la hipermetilación aberrante de promotores génicos en 22 schwannomas vestibulares y asociaciones significativas del gen *CASP8* (*caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase*) con el gen *RASSF1A* (*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1*) y con la edad del paciente y el grado tumoral. También se ha observado relación entre la pérdida auditiva y la metilación de *TP73*, así como una correlación inversa entre la hipermetilación de *RASSF1A* y el grado clínico de crecimiento tumoral (Lassaletta et al. 2006).

1.3. MICROARRAYS

La tecnología de microarrays es un sistema de alto rendimiento ampliamente utilizado en la era post-genómica para la investigación básica y aplicada. En los últimos años, los microarrays han evolucionado para ofrecer a los investigadores un amplio rango de plataformas para el estudio de los procesos biológicos a diferentes niveles moleculares: genómica, transcriptómica, proteómica o farmacogenómica, entre otros. Los microarrays nos permiten no sólo analizar numerosas muestras al mismo tiempo, sino también analizar múltiples moléculas dentro de una misma muestra biológica, proporcionando una gran cantidad de datos que, una vez adquiridos, deben ser funcionalmente integrados para hallar patrones comunes dentro de un grupo definido de muestras biológicas. Así, los datos obtenidos nos proporcionan una representación realista de las características moleculares de una muestra (especie, individuo, tejido, célula, enfermedad, etc.) y cómo estas moléculas interactúan entre sí para crear un fenotipo específico o global.

Como ocurre con toda nueva metodología, los microarrays han atravesado una serie de modificaciones en el diseño experimental de plataformas, estrategias de marcaje específico y adquisición de datos. Sin embargo, como técnica compleja que ofrece una gran cantidad de información, es en el análisis estadístico así como en la interpretación de los resultados, donde más controversia se ha producido (Benson and Breitling 2006; Breitling 2006; Kawasaki 2006). A pesar de ello, actualmente es una técnica ampliamente utilizada y aceptada, que contribuirá con grandes avances en la investigación biomédica.

Las actuales clasificaciones de cáncer incluyen una gran variedad de tipos y subtipos tumorales. Para que el paciente reciba una terapia apropiada es necesario identificar con la mayor exactitud posible el tipo de neoplasia que presenta. El análisis de las características morfológicas de las muestras biológicas es el método de diagnóstico actual, pero da una información limitada al omitir muchos aspectos tumorales importantes como la tasa de proliferación, la capacidad de invasión y metástasis, así como el posible desarrollo de mecanismos de resistencia celular al tratamiento. Por lo tanto, para clasificar apropiadamente los subtipos celulares en los tumores es necesario el uso de métodos de diagnóstico moleculares.

Tradicionalmente, estos métodos analizan el ADN, ARN o la proteína de un marcador tumoral determinado que esté correlacionado con un tipo tumoral específico, pudiendo ofrecer o no información biológica sobre la patogénesis o la progresión tumoral. Sin embargo, el actual uso de la técnica de microarrays proporciona una gran cantidad de información a nivel molecular que se puede extraer e integrar para encontrar patrones comunes dentro de un determinado grupo de muestras tumorales. Por lo tanto, los microarrays pueden ser usados en combinación con otros métodos diagnósticos para complementar la información obtenida. Este método está mejorando el diagnóstico en cáncer, ya que se están descubriendo nuevos marcadores diagnósticos y terapéuticos, favoreciendo la identificación de nuevos subtipos tumorales que se correlacionan con el tratamiento y la evolución (Rhodes et al. 2004; Michiels, Koscielny, and Hill 2005).

Existen dos tipos básicos de microarrays de ADN: arrays de oligonucleótidos (Lockhart et al. 1996) y arrays de ADNc (Schena et al. 1995), ambos utilizan secuencias de ADN adheridas a la superficie de un soporte sólido. Estas secuencias se obtienen de bancos de datos génicos, colecciones de clones o librerías de ADNc. En el caso de los arrays de oligonucleótidos, se sintetizan secuencias conocidas de ADN de hasta 25 nucleótidos, que se incluyen sobre la superficie de soporte usando reacciones semejantes a la fotolitografía. Con este método se pueden incorporar millares de secuencias distintas que representan más de 18 000 genes en un microarray de poco más de 1cm². En el segundo tipo de arrays, se depositan fragmentos de ADNc en forma de puntos en la superficie de soporte, por medio de un sistema robotizado que permite adherir las secuencias deseadas. Las secuencias diana de ADNc, marcadas radioactiva o fluorescentemente por medio de una transcripción reversa de ARN, son hibridadas en la matriz sólida y las señales producidas son captadas y procesadas informáticamente (Hardiman 2004; Mello-Coelho and Hess 2005). Los perfiles de expresión génica obtenidos se utilizan para la comparación o predicción de clases: control-enfermedad, tejido-tejido, grados tumorales, supervivencia, respuesta a tratamiento, etc. Además de identificar genes diferencialmente expresados, los microarrays nos permiten descubrir nuevos marcadores tumorales que podrían tener un gran impacto en la práctica clínica y la terapéutica del cáncer. La **figura 1.3.** muestra la tecnología de microarrays como una herramienta útil para el proceso de descubrimiento de nuevas terapias.

Los dos principales objetivos de los estudios básicos de microarrays en cáncer son: 1) la identificación de clases o grupos tumorales conocidos y, 2) establecer nuevos grupos tumorales. Para ello se usan dos aproximaciones en el análisis de datos, el método supervisado para el primer objetivo y el método no supervisado para el segundo. Los métodos supervisados de análisis (t-test, ANOVA, etc.) se utilizan predominantemente para identificar las diferencias a nivel molecular entre dos clases conocidas (comparación entre clases) y para diagnosticar o predecir a qué clase pertenece una muestra tumoral (predicción de clase). Sin embargo, en los métodos no supervisados las muestras no son catalogadas como pertenecientes a diferentes clases clínico-patológicas antes del análisis de los datos (clase desconocida) (Simon et al. 2003a). Una de las aproximaciones estadísticas no supervisadas más utilizadas es el cluster jerarquizado, que produce una combinación secuencial de genes y/o muestras, determinada por una

medida definida de similitud o distancia entre perfiles de expresión, siendo el más utilizado en oncología el coeficiente de correlación de distancias de Pearson.

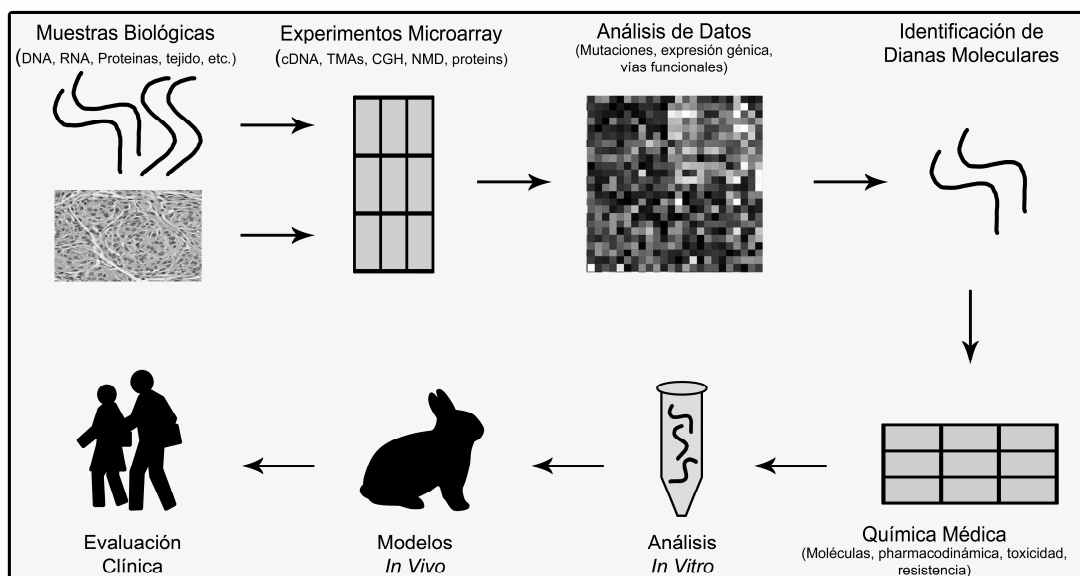


Figura 1.3. Aplicación de microarrays en la práctica clínica. Las muestras biológicas son hibridadas en plataformas de microarrays y los datos resultantes se analizan para identificar y validar dianas potenciales. Los nuevos agentes terapéuticos son desarrollados y evaluados para su uso en pacientes.

La comunidad científica continúa intentando establecer los métodos apropiados de clasificación del cáncer derivados de los datos de microarrays. Sin embargo, la diversidad de diseños experimentales, así como la propia variabilidad biológica y el reducido número muestral del que a veces se dispone para estudio, hace que sea necesario no generalizar el uso de métodos estadísticos sino por el contrario, definir los más apropiados para cada caso. Para permitir la comparación de experimentos entre laboratorios o para analizar en el futuro, con métodos estadísticos validados, los datos obtenidos, la *Microarray Gene Expression Data Society* ha propuesto unos estándares de información mínima en experimentos de microarray (MIAME) para el envío de resultados a bases públicas de datos (Ball et al. 2004; Brazma et al. 2001).

1.3.1. MICROARRAYS EN MENINGIOMAS Y SCHWANNOMAS

Actualmente son pocos los estudios que han determinado patrones de expresión génica mediante microarrays en meningiomas o en schwannomas. Además, estos estudios no se han realizado en series

grandes de muestras tumorales o se han hecho comparando las muestras tumorales con controles poco representativos. La referencia más temprana en la literatura para microarrays en meningiomas es un trabajo en el que se utilizan 1004 genes para identificar los perfiles de expresión génica en tumores cerebrales —5 glioblastoma multiforme (GBM), 2 astrocitomas de grado II, 1 meningioma, 2 tejidos de cerebro histológicamente normal y adyacentes a 2 de los 5 GBM y 2 tejidos cerebrales normales obtenidos de pacientes con traumatismo craneal—. Las muestras tumorales fueron comparadas con tejido de cuerpo calloso normal como tejido control. Excepto por una expresión diferencial de laminina $\alpha 4$, comparado con los tumores gliales, no se encontró ningún resultado significativo para el meningioma (Ljubimova et al. 2001).

El primer perfil de expresión génica de alto rendimiento en meningiomas, se realizó en 15 muestras tumorales, grados I y II, comparado con meninge post-mortem como control no neoplásico. Los autores identificaron algunos genes ya conocidos con expresión alterada, incluyendo *GHR*, *IGF2*, *IGFBP-7* y *EDNR4* y algunos nuevos como *CTSK*, *NR2F6*, *RAD*, *BCR*, y *JUNB*. Un subgrupo de 133/1393 genes mostró expresión diferencial entre los tumores de grado I y el grupo de grado II/III (Watson et al. 2002).

Un estudio posterior sobre la progresión en meningiomas, analizó el perfil de expresión génica de 30 muestras usando un microarray que representa 2600 genes asociados a mitosis, control del ciclo celular, oncogénesis y apoptosis. Como control se co-hibridó una mezcla de 8 tejidos humanos diferentes (corazón, bazo, placenta, riñón, músculo esquelético, hígado, cerebro y pulmón). Se encontró sobre-expresión en 27 genes e infra-expresión en 37 genes para las muestras grado II/III comparado con los meningiomas benignos. Los genes que mostraron mayor expresión fueron *PTGDS*, *CLU*, *MGP*, *MMP12*, *VIM*, *TIMP1*, *ANXA2*, *BAD*, *CCND1* y *LIG1*. No se encontraron clasificadores representativos para cada grado tumoral, pero un subgrupo de genes mostró expresión diferencial entre los meningiomas benignos y el grupo de atípicos/anaplásicos. Este subgrupo incluye la sobre-expresión de *CDK4*, *GADD45A*, *CKS2*, *CDK5R1*, *PCNA*'s, *AURKA* y *CENPF*. También se encontró una correlación entre dos subgrupos de genes y la pérdida de los cromosomas 10 y 14 detectadas por CGH. Ninguno de los genes significativos encontrados se localiza en esos cromosomas por lo que podría representar efectos

derivados de las pérdidas cromosómicas. Los genes estaban relacionados con las vías IGF (*IGF2*, *IGFBP3* y *AKT3*) o WNT (*CTNNB1*, *CDK5R1*, *ENC1* y *CCND1*) (Wrobel et al. 2005).

Cuando no hay disponible líneas celulares para un tipo tumoral, se utilizan cultivos primarios para realizar experimentos in vitro. Un estudio comparó los perfiles de expresión génica de meningiomas en cultivo primario con muestras tumorales congeladas. Se estudió el perfil de expresión génica para 12000 genes en muestras congeladas de 3 meningiomas y en cultivos primarios de esas mismas muestras. Los cultivos primarios mostraron sobre-expresión de 51 genes, especialmente relacionados con matriz extracelular, citoesqueleto y receptores de superficie, e infra-expresión de 19 genes, comparado con las muestras congeladas correspondientes. Estas diferencias de expresión nos alertan sobre la precaución que se necesita a la hora de diseñar experimentos o al analizar los resultados (Sasaki, Hankins, and Helm 2003). Han sido muchos los intentos por obtener cultivos de meningioma adecuados y, para ello, la tecnología de array-CGH puede ser usada para obtener el cariotipo de las líneas celulares de meningioma después de ser inmortalizadas en busca de posibles alteraciones numéricas o estructurales (Baia et al. 2006).

En otro estudio, se utilizaron microarrays que contienen 19200 ADNc para comparar la expresión génica de 10 meningiomas con tejido cerebral normal. Se encontraron 364 genes pertenecientes a las vías WNT, MAPK, PI3K y Notch, que mostraron desregulación en al menos la mitad de los tumores. Los autores afirmaron que el fenotipo de los meningiomas es producto de la sobre-expresión de muchos genes que producen una función celular anómala, sumado a la infra-expresión de otros genes que intentan corregirla. De esta forma, las interacciones inhibitorias y de estimulación componen la base del fenotipo específico de los meningiomas (Fathallah-Shaykh et al. 2003). La técnica de microarrays también ha permitido establecer distintos patrones de expresión para 35 genes entre meningiomas benignos espinales e intracraneales. La expresión de la mayoría de estos genes, principalmente relacionados con vías de transducción de señales, fue mayor en los tumores espinales que en los intracraneales (Sayagues et al. 2006).

La tecnología de arrays también ha permitido establecer patrones citogenéticos y moleculares en meningiomas. Una serie de 14 meningiomas y 4 schwannomas fue analizada por dHPLC y array-CGH, encontrando 6 grandes deleciones y 6 mutaciones (Szijian et al. 2003). En otro estudio, el ADN de 26 meningiomas se analizó por microarrays, detectando pérdidas de 22q en el 54% de las muestras; Además, en el subtipo meningotelial se observó una frecuente amplificación de los genes *INS* y *TCL1A* (Wada et al. 2004). Un posterior estudio de anomalías cromosómicas y alteraciones genéticas en 31 meningiomas mostró frecuentes pérdidas de 22q (61%), amplificación de *MSH2* (52%) y deleciones de *GSCL* (42%) y *HIRA* (23%) (Wada et al. 2005). El cromosoma 1 ha sido también estudiado por array-CGH en 82 meningiomas; los resultados mostraron múltiples deleciones e identificaron 4 *loci* candidatos en este cromosoma (Buckley et al. 2005a). Los *loci* para los genes *NF2* y *DAL-1/4.1B* han sido estudiados por LOH y array-CGH en 63 meningiomas y sus correspondientes muestras de sangre periférica. Se observó una esperada alta frecuencia de monosomía o grandes deleciones del cromosoma 22 y una menor frecuencia a las previamente publicadas para el cromosoma 18, vinculando al gen *DAL-1/4.1B* más a la progresión que a la neogénesis de meningiomas (Nunes et al. 2005).

Trabajando con neurofibromatosis, se analizó el ADN de 116 pacientes NF2, utilizando un array-CGH que cubría una región de 7.4 Mb en 22q, que incluía el gen *NF2*; se encontraron deleciones completas de este gen en 24 casos (Bruder et al. 2001). Otro trabajo estudió por array-CGH una región de 11 Mb para 22q en 47 muestras de schwannoma y ADN constitucional; los resultados delimitaron 3 patrones consistentes de deleción, que se correspondían con monosomía del cromosoma 22 y con grandes deleciones incluyendo o no al gen *NF2* (Mantripragada et al. 2003). Un estudio posterior de array-CGH analizó una región de 34.7 Mb, cubriendo enteramente a 22q, en 88 muestras de schwannoma y ADN constitucional. Se localizaron 8 *loci* con variaciones en el número de copias y una correlación entre la posición cromosómica de ruptura y la localización de duplicaciones segmentales (Diaz et al. 2005). Utilizando un array-CGH para el cromosoma 22 en muestras de schwannomatosis y neurofibromatosis, se encontraron 2 regiones con variación en el número de copias y se observaron reordenamientos específicos de IGL y el gen *CABIN1*, por lo cual se propuso este gen como candidato para estos síndromes (Buckley et al. 2005b).

La tecnología de microarrays de expresión ha sido empleada también en schwannomas. El primer estudio de perfil de expresión génica para este tipo tumoral, se realizó en 7 SV y 1 nervio vestibular normal obtenido de uno de los 7 pacientes. Entre los 25.920 genes o EST's estudiados, 42 mostraron sobre-expresión (*SPARC*, *ENG*, *RHOB*, etc.) y 8 mostraron disminución significativa de la expresión (*VIL2* [ezrin], *RBM5*, etc.) (Welling et al. 2002). También se ha estudiado la expresión de 1176 genes, comparando cultivos primarios de schwannoma y de células de schwann; así, las células de schwannoma mostraron sobre-expresión de 7 genes (*ITGA6*, *ITGB1*, *ITGB4*, *VEGF*, *IGFBP1*, *TNK1* y *PRNP*) e infra-expresión de otros 7 (*MMP11*, *MMP14*, *PGF*, *NGFR*, *TIE1*, *IL11* y *MAG*) (Hanemann et al. 2006). Por último, el uso de microarrays de oligonucleótidos en clones establemente transfectados con expresión regulada de *NF2*, ha permitido observar una variabilidad significativa, no influenciada por la expresión del transgen *NF2*, lo que sugiere que los métodos comúnmente utilizados para la selección de clones, son los responsables de estas variaciones no biológicas (Oh et al. 2003).

Los estudios anteriormente mencionados, aunque orientativos, no constituyen el estado real de los patrones de expresión de los genes estudiados en cada caso. Esto se debe a varios factores: a que se ha realizado su comparación con muestras control que no son representativas de la expresión normal de las células que dan lugar a los meningiomas o a los schwannomas, a que el tamaño de la muestra es reducido, o bien porque son comparados con muestras provenientes de cultivo. Sin embargo, en su conjunto, los perfiles de expresión de microarrays son una gran fuente de marcadores útiles, que permitirán el diagnóstico de diferentes tumores por medio de técnicas convencionales en los laboratorios clínicos para su posterior aprovechamiento en la práctica oncológica tanto clínica como quirúrgica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 2.1.** Conocer el perfil de expresión global de 96 genes relacionados con cáncer en meningiomas y schwannomas.
- 2.2.** Identificar genes diferencialmente expresados en meningiomas y schwannomas en relación con las alteraciones moleculares del gen *NF2*, la pérdida de heterocigosidad del brazo largo del cromosoma 22 y el grado tumoral.
- 2.3.** Identificar marcadores moleculares con potencial diagnóstico, pronóstico y terapéutico y desarrollar modelos basados en los perfiles de expresión génica que permitan predecir la clase de futuras muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. MUESTRAS TUMORALES

Se obtuvo muestra de 65 tejidos tumorales a partir de la extirpación quirúrgica de 42 meningiomas y 23 Schwannomas. Las muestras fueron inmediatamente congeladas en N₂ líquido y conservadas a -80°C. Todas las muestras fueron clasificadas histológicamente de acuerdo con los criterios recomendados por la OMS (Kleihues et al. 2002). El contenido celular tumoral fue de un 75-80% aproximadamente.

La serie estudiada consta de:

32	Meningiomas grado I	23	Schwannomas
6	Meningiomas grado II		
4	Recidivas de meningiomas grado I		

3.1.2. SANGRE PERIFÉRICA

Se obtuvo muestra de sangre periférica de los 65 pacientes, fueron anti-coaguladas con EDTA y conservadas a -80°C hasta su posterior uso. También se obtuvo muestra de sangre periférica de voluntarios sanos para obtener ADN control.

3.1.3. MUESTRAS CONTROL

Como control de meninge normal se utilizó 3 preparados comerciales de ARN extraído a partir de meninge cerebral de adultos normales: 1) Tissue, total RNA, human adult normal, Brain, cerebral meninges. USBiological Catalog No T5595-7251. 2) Tissue, total RNA, human adult normal, Brain, cerebral meninges. USBiological Catalog No T5595-7252A. 3) Human adult normal tissue RNA, cerebral meninges. Biochain Catalog No R1234043-50-BC.

3.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.2.1. ADN

La extracción del ADN genómico de tumor y sangre periférica se llevó a cabo utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega: Se basa en un proceso de 4 pasos: Primero se lisan las células y núcleos. Para ADN de linfocitos de sangre periférica, este paso involucra un lisado de eritrocitos de forma previa. En este momento se puede incluir un paso de digestión con RNasa, dependiendo del uso posterior de la muestra. Las proteínas celulares son removidas por precipitación en sales, dejando libre el ADN de alto peso molecular. Finalmente el ADN genómico es concentrado y lavado por una precipitación con isopropanol. Se conserva a -20°C.

La concentración de ADN se cuantifica espectrofotométricamente a una longitud de onda (λ) de 260 nm (A260). Una unidad de densidad óptica (DO) a esta λ equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de doble cadena. La relación A260/A280 se utilizó para determinar la pureza de las muestras, siendo el valor óptimo de 1.6.

3.2.2. ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el Rneasy® Mini Kit de Quiagen: Este proceso usa las propiedades de unión selectiva de una membrana de sílice para retener, purificar y eluir el ARN con longitudes mayores a 200 bases. La muestra tumoral es lisada y homogenizada en una solución desnaturalizante que contiene guanidina isotiocianato (GITC), lo que inmediatamente inactiva las RNasas. Se añade etanol para mejorar las condiciones de unión a la membrana y se pasa por una columna RNeasy donde el ARN total se une a la membrana. Se realizan dos pasos de lavado de impurezas, añadiendo en el intermedio una dilución de DNasa. El ARN total obtenido es diluido en agua libre de RNasas y conservado a -80°C.

La concentración de ARN se cuantifica espectrofotométricamente a una longitud de onda (λ) de 260 nm (A260). Una unidad de densidad óptica (DO) a esta λ equivale a 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN. La relación A260/A280 se utilizó para determinar la pureza de las muestras, siendo el valor óptimo de 1.8.

3.2.3. EXTRACCIÓN DE ARNm

Para la extracción de ARNm se utilizó el Oligotex® mRNA Mini Kit de Quiagen: El ARNm representa el 1-5% del ARN total. Para su aislamiento y purificación se utilizan partículas de látex/poliestireno con oligómeros dT que se unen a las colas poly-A presentes en el ARNm y por medio de centrifugado y lavados en columnas puede finalmente ser eluido y recuperando.

3.3. ESTUDIOS GÉNICOS

3.3.1. ESTUDIO MUTACIONAL DEL GEN *NF2*

Se amplificó para cada muestra tumoral el ADN del gen *NF2* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleándose cebadores específicos previamente descritos (Rouleau et al. 1993c). (Anexo I: Tabla 3.1.) En los casos en que la frecuencia de una alteración nos sugería la presencia de un polimorfismo constitucional, también se amplificó el ADN de sangre periférica correspondiente. Para la amplificación se utilizó un termociclador MJ Research INC PTC-100TM. Se inicia con una desnaturalización previa del ADN durante 5' a 94°C, seguido de un programa de 35 ciclos que incluye: desnaturalización a 94°C durante 30"; alineamiento durante 30" a una temperatura variable para cada pareja de cebadores utilizados; una etapa de elongación a 72°C durante 90". Al completar los ciclos se somete el amplificado a una elongación de 8' a 72°C. Mezcla de reacción: ADN molde 100 ng. Tampón de PCR 10x (1x Tris.HCl 75 mM (pH 9.0), MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂ SO₄ 20 mM). Mezcla de los cuatro dNTPs 100 μM c/u. Los cebadores (sentido y antisentido) 10 μM c/u. ADN polimerasa termoestable de BIOTOOLS 1U/ μl . Agua estéril hasta completar 20 μl de volumen final de reacción.

La verificación del producto amplificado se hizo en electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% con BrEt [10mg/ml] en tampón Tris Borato EDTA (TBE) 1x. Se utilizó como marcador de peso molecular pBR322DNA/BsuRI (HaeIII) de Biotools. Se cargó 4µl de muestra con 3µl de tampón de carga tipo IV (0.25% de azul de bromofenol y 40% de sacarosa). Los resultados se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

3.3.2. POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA (SSCP)

Las variaciones de conformación y plegamiento del ADN en presencia de alteraciones de secuencia pueden ser visualizados por cambios en el patrón de movilidad, tanto de las cadenas desnaturalizadas como en el heterodúplex, en una electroforesis vertical en poliacrilamida. Los productos de PCR se mezclan con un volumen igual (5µl) de tampón de SSCP (formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol y xylene cyanol 0.05%). Se desnaturaliza el ADN durante 5' a 95°C y se pone inmediatamente en hielo para evitar la renaturalización. Las muestras se cargan, junto con un control sin desnaturalizar, en un gel de acrilamida/bis acrilamida 37,5:1 en concentraciones desde el 6% al 12% (**Anexo I: Tabla 3.1**). Se somete a una corriente de 250V durante 2 a 5 horas. Para algunos fragmentos se hizo la migración en geles con un 10% de glicerol durante 16 horas a un potencial de 4 a 6 vatios, con refrigeración por agua.

El revelado de las bandas se realiza con una tinción de plata: fijación de las bandas en el gel de acrilamida con solución etanol/ácido acético (3:1), impregnación con solución de nitrato de plata (6gr/l) en condiciones desnaturalizantes (formaldehído 0.1%), revelado de las bandas en el gel mediante su precipitación con una solución de carbonato sódico (150g/l), formaldehído (0.1%) y tiosulfato sódico (0.07%). Se detiene la reacción con solución de ácido acético al 1%. Para su conservación se transfieren sobre papel Whatman 3MM Chr y se seca con succión a 80° C durante 2 horas.

3.3.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DESNATURALIZANTE DE ALTO RENDIMIENTO

Utilizando diferentes aproximaciones basadas en PCR, esta técnica puede ser utilizada para genotipado, determinar pérdidas o ganancias de alelos, detección de polimorfismos y mutaciones

puntuales. Se amplifica por PCR el fragmento de gen a estudiar. Posteriormente se realiza una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de una disminución progresiva de la temperatura de 95°C a 25°C a una velocidad de 1°C cada 20 segundos, para conseguir una renaturalización paulatina en la que se forme de nuevo la doble hebra de ADN, uniéndose las hebras exactamente igual que las originales, tanto “normal” como mutada (homodúplex), y además provocando que se unan combinaciones de las cadenas sentido y antisentido de cada homodúplex, para formar los llamados heterodúplex. Los heterodúplex se separan por cromatografía líquida de fase reversa en una fase estacionaria inerte y eléctricamente neutra e hidrofóbica compuesta por partículas de poliestireno-divinilbenceno de 2-3 μm de diámetro. Se utiliza acetato de trietilamonio (TEAA), que posee carga positiva, para unir el ADN a la matriz de una columna que lo retiene según su longitud. La elusión de las moléculas de ADN se consigue utilizando acetonitrilo (solvente orgánico) que permite la desorción de los iones anfifílicos y moléculas de ADN. Dicha elusión se percibe en un detector ultravioleta a una absorbancia de 254 nm. El tiempo de retención de la doble cadena de ADN cambia con la temperatura de la columna. La desnaturalización en los heterodúplex es más extensa que la correspondiente a los homodúplex que tienen las bases perfectamente emparejadas, por consiguiente, los heterodúplex se retienen menos y se muestran como uno o más picos adicionales.

3.3.4. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL ADN

Las muestras con variaciones en el patrón de bandas en los geles de poliacrilamida o en el dHPLC son secuenciadas. Para ello se reamplifica la muestra en 50 μl finales de reacción. Al ADN obtenido se le somete a un protocolo de secuenciación mediante el ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Alameda, CA). Para evitar la consideración de falsos positivos por la aparición de artefactos del secuenciador automático se procede a la secuenciación bidireccional de cada fragmento: Se hace una reacción lineal específica de cada hebra de la doble cadena del ADN, donde se incorporan dideoxi-nucleótidos marcados con un fluoróforo específico para cada tipo de nucleótido. El producto de esta reacción es precipitado y lavado con una solución de acetato sódico (3mM, pH 5.2) y etanol en frío. Se conserva a -20°C hasta su análisis en electroforesis capilar (ABI 3100 Avant, Applied Biosystems).

3.3.5. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH) EN 22q

Se utilizó el UniSTS del NCBI para escoger 5 marcadores microsatelitales para la región del brazo largo del cromosoma 22 que incluye al gen *NF2* (Anexo I: Tabla 3.2.). Mediante una reacción de PCR estándar se incorporan cebadores marcados en 5' en una de las cadenas con un fluoróforo (6'-FAM, Applied Biosystems), los cuales son detectados y analizados mediante electroforesis capilar en el analizador genético ABI PRISM 3100Avant utilizando POP4 como polímero. Tras la PCR, 1.0 µl del producto amplificado con 0.5 µl del estándar de tamaño GeneScan 500ROX marcado fluorescentemente (Applied Biosystems) se mezclan con 20 µl de formamida des-ionizada de alta pureza. Para la completa desnaturalización, se agita y se mantiene 5' a 95°, enfriándolo inmediatamente en hielo. La comparación entre la composición alélica de cada marcador para los ADN de la sangre y del tumor correspondiente, utilizando el software GeneMapper (PE) y Excel (Microsoft), nos permite determinar la existencia de LOH. El criterio utilizado para delimitar los rangos que marcan estas pérdidas ha sido: Se determina mediante la ecuación $LOH = T2 \times N1 / T1 \times N2$ (Canzian et al. 1996). Siendo T1 el área del primer pico correspondiente al alelo mayor de la muestra tumoral; T2 el área del segundo pico correspondiente al alelo menor de la muestra tumoral; N1 el área del primer pico correspondiente al alelo mayor de la muestra de sangre o normal, y N2 el área del segundo pico correspondiente al alelo menor de la muestra de sangre o normal. Se ha considerado a los valores menores de 0.6 indicadores de pérdida en el alelo mayor y por encima de 1.67 en el alelo menor. Estos valores consideran como perdido un alelo de la muestra tumoral (LOH) cuando decrece un 40% respecto a su valor en el ADN en sangre. En caso contrario se considera que retiene ambos alelos, salvo en aquellos casos en los que no existe diferencia de tamaño entre ellos (casos no informativos).

3.4. AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE LIGASA

3.4.1. MLPA DEL GEN *NF2*

Para el análisis de grandes deleciones y duplicaciones del gen *NF2* se utilizó la SALSA P044 *NF2* MLPA Kit de MRC-Holland (Amsterdam, NL). El kit incluye sondas para los 17 exones codificantes y 2

para la región promotora del gen NF2. Como control incluye 14 sondas para diferentes localizaciones cromosómicas (**Anexo I: Tabla 3.3.**). El protocolo de MLPA se realizó usando 100ng para cada ADN control y muestra tumoral. La desnaturalización e hibridación de las sondas es seguida por una reacción de ligación y posterior PCR múltiple.

DESNATURALIZACIÓN DEL ADN E HIBRIDACIÓN DE LAS SONDAS: Diluir la muestra de DNA (100 ng DNA) con TE a 5 µl. Calentar 5 minutos a 98°C; enfriar a 25°C antes de abrir el termociclador. Agregar: 1.5 µl de SALSA Probe-mix + 1.5 µl de MLPA buffer. Incubar 1 minuto a 95°C, incubar 16 horas a 60°C.

REACCIÓN DE LIGACIÓN: Reducir la temperatura del termociclador a 54°C. Manteniendo la temperatura a 54°C, añadir 32 µl de mix Ligase-65 (Mezclar 3 µl de Ligase-65 buffer A + 3 µl Ligase-65 buffer B + 25 µl H₂O. Agregar 1 µl Ligase-65 y mezclar de nuevo). Incubar 15 minutos a 54°C, seguidamente calentar 5 minutos a 98°C.

REACCIÓN DE PCR: Mezclar 4 µL 10XSALSA PCR buffer + 26 µl H₂O+ 10 µl de la reacción de ligación de MLPA. Mantener los tubos en el termociclador a 60°C. Agregar 10 µl de mix Polymerase (Mezclar 2 µl de SALSA PCR-primers + 2 µl SALSA Enzyme Dilution buffer + 5.5 µl H₂O. Agregar: 0.5 µl SALSA Polymerase). Empezar la reacción de PCR (30 segundos 95°C; 30 segundos 60°C; 60 segundos 72°C y 33 ciclos. Terminar con 20 minutos de incubación a 72°C). Un microlitro de los productos amplificados es analizado utilizando el secuenciador ABI 3100 Avant (Applied Biosystems).

3.4.2. MS-MLPA

Para los análisis del estado de metilación de la región promotora de 25 genes supresores de tumor frecuentemente silenciados por hipermetilación se utilizó la SALSA MS-MLPA Kit ME001 de MRC-Holland (Amsterdam, NL) (**Anexo I: Tabla 3.4.**). El diseño de las sondas en este kit es similar al de un MLPA normal, excepto que las regiones detectadas por las sondas contienen una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *HhaI*. Después de una digestión con dicha enzima, las sondas cuya secuencia de reconocimiento está metilada generarán una señal. Si el sitio no está metilado, la digestión de las sondas hibridadas al ADN impedirá la amplificación exponencial y no será detectada ninguna señal en el posterior análisis de los fragmentos. Se incluyen 15 sondas control, pertenecientes a genes relacionados con cáncer y que no son reconocidas por la enzima de restricción. Debido a que cada

muestra es procesada en dos ensayos, uno utilizando enzima de restricción y otro sin este paso, el kit ofrece además del análisis de metilación de promotores, un análisis de pérdidas y ganancias para cada uno de los 40 genes incluidos, de la misma forma que un MLPA normal.

3.4.3. ANÁLISIS DE MLPA Y MS-MLPA

El análisis de los datos se hizo con el programa MRC-Coffalyser version 2 de MRC-Holland (Amsterdam, NL). Se realizó una intra-normalización para cada muestra, basada en las sondas control, y posteriormente cada muestra tumoral se normalizó por las sondas control de 5 muestras control. La disminución progresiva de señal de las sondas dentro de cada muestra en el secuenciador automático se corrigió por regresión simple. Los límites relativos normales se establecieron entre 0.75 y 1.3. Para la obtención de niveles de significación para los datos de MLPA y MS-MLPA se usó también el programa Coffalyser V2.

3.5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN

3.5.1. MICROARRAYS

Para el análisis de expresión génica por microarrays se utilizaron membranas GEArray™ Q Series (SuperArray Bioscience Corporation) que contienen 96 fragmentos de ADNc de genes asociados con vías biológicas específicas relacionadas con cáncer, además de genes constitutivos como control positivo y controles negativos (**Anexo I: Tabla 3.5.**). Estos genes se pueden agrupar en 6 diferentes grupos, de acuerdo a su función: 1) Control del ciclo celular y reparación del daño al ADN, 2) apoptosis y senescencia celular, 3) moléculas de transducción de señales y factores de transcripción, 4) adhesión, 5) angiogénesis e 6) invasión y metástasis. Los fragmentos de ADNc específicos están impresos en una membrana de nylon de 3.8 x 4.8 cm. Cada fragmento se encuentra por cuadruplicado para mejorar su cuantificación y fiabilidad. (**Figura 3.1.**)

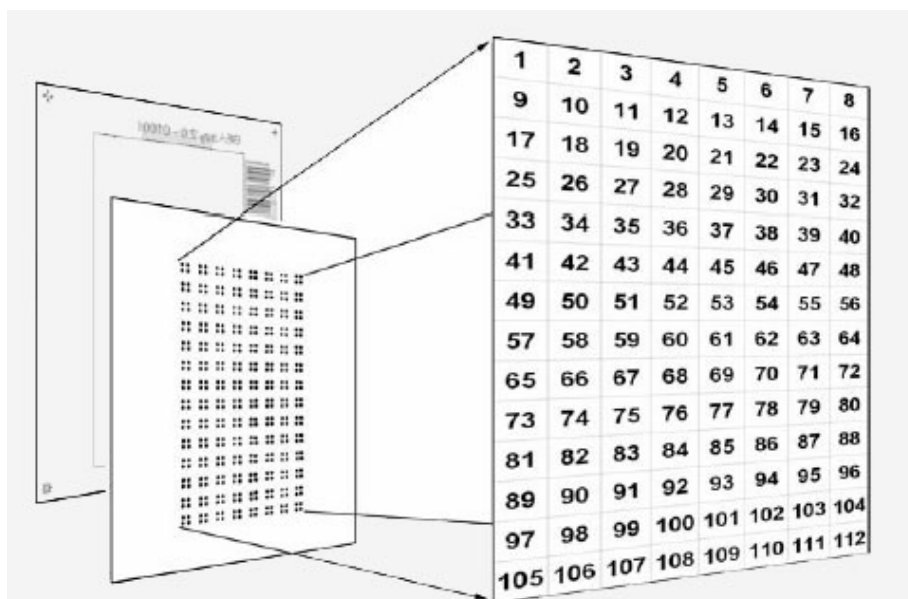


Figura 3.1. Membrana de hibridación mostrando la posición de las sondas por cuadruplicado.

3.5.1.1. PREHIBRIDACIÓN

Se prehibrida a 60°C la membrana con ADN de esperma de salmón desnaturalizado a una concentración final de 100ug/ml. MEZCLA DE ANNEALING: ARNm de 0.5 a 1ug. RT Primer (P) 1ul. RNase-free H₂O, ajustado a 10ul de volumen final. Se calienta a 70° por 3' y luego a 37° por 10'. MEZCLA RT: Buffer BL 4ul. RNase-free H₂O 4ul. RNase inhibitor (RI) 1ul. Reverse transcriptase (RE) 1ul. Volumen final 10ul. Se incuba a 37° por 1'. REACCIÓN DE RT: Se transfieren los 10ul de mezcla RT precalentado a los 10ul de la mezcla de annealing. Incubación a 37° por 25'. Se calienta a 85° por 5' para hidrolizar el ARN e inactivar la RE. MEZCLA LPR: Buffer L 15ul. Buffer AF 9ul. [α -33P]-dCTP 5ul. LE (DNA Polimerase) 1ul. Volumen final 30ul. Incubación a 37° por 1'. REACCIÓN DE LPR: Se transfieren los 20ul de reacción RT precalentado a los 30ul de mezcla LPR. Termociclador: 85° por 5'. 30 ciclos de: 85° por 1' / 50° por 1' / 72° por 1'. Finalizando con 72° por 5'. DESNATURALIZACIÓN DE LA SONDA: Se calienta el ADNc marcado a 94° por 5' y se pone rápidamente en hielo. (**Figura 3.2.**)

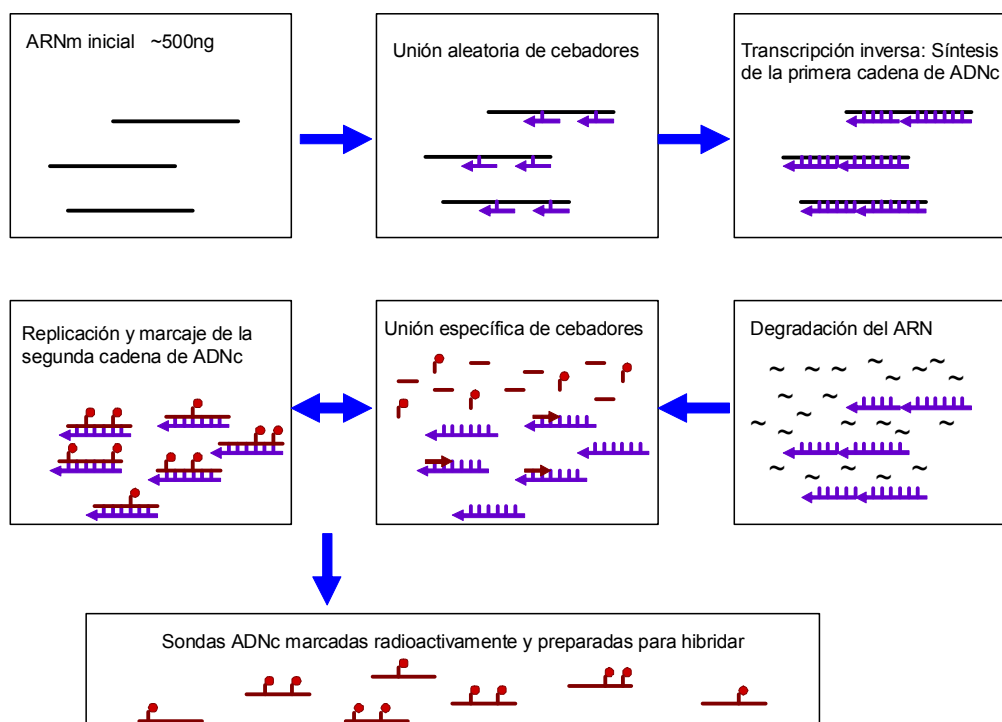


Figura 3.2. Prehibridación. El ADNc se produce por transcripción inversa y posteriormente es marcado con α - ^{33}P durante la amplificación.

3.5.1.2. HIBRIDACIÓN

Se añade todo el contenido de la sonda desnaturalizada a 0.75ml de GEApreehyb precalentado. Se añade GEAhbyb, que contiene la sonda, al tubo de hibridación. Se hibrida toda la noche en horno a 60° con agitación continua de 5 a 10rpm.

3.5.1.3. LAVADOS

Solución 1: 2X SSC, 1% SDS.

Solución 2: 0.1X SSC, 0.5% SDS.

Se lava la membrana 2 veces con 5ml de solución 1 a 60° con agitación a 20-30rpm durante 15'. Se lava la membrana 2 veces con 5ml de solución 2 a 60° con agitación a 20-30rpm durante 15'. Se pone la membrana dentro de una película de plástico sellado evitando burbujas de aire.

3.5.1.4. ADQUISICIÓN DE IMAGEN Y DATOS

Para la adquisición de imágenes se utilizó el sistema autoradiográfico Cyclone™ Storage Phosphor System (Packard BioScience Company). Las membranas son expuestas a una pantalla de almacenamiento (Cyclone Storage Phosphor Screen) que absorben la energía emitida por la radioactividad de la muestra y posteriormente la libera como una luz azul cuando es excitada por un laser rojo (Cyclone 3000™). La intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de actividad en la membrana y es transformada en una imagen digitalizada por el OptiQuant™ Image Analysis Software.

La imagen obtenida es analizada con el programa Phoretix™ Array version 3.00 (Nonlinear dynamics Ltd.). Se define el tamaño y localización de cada uno de los 448 puntos de la imagen. Para la correcta obtención de los volúmenes (píxeles) de la imagen, se sustrae la intensidad correspondiente al ruido de fondo circundante a cada punto. El programa entrega una tabla de datos exportable con la intensidad media obtenida para cada uno de los 112 cuadruplicados que componen la membrana.

3.5.2. EXPRESIÓN MEDIANTE RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Para la validación de los datos obtenidos en las membranas de microarray se realizó un ensayo cuantitativo utilizando el ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System, que permite la cuantificación relativa de ácidos nucleicos por medio del método comparativo CT a través de la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde $\Delta\Delta CT$ es el nivel de señal normalizada de una muestra referido al nivel de señal normalizada en la muestra de calibración correspondiente.

Como control endógeno se utilizó el gen GAPDH y se midieron los niveles de expresión, en 9 muestras, de 4 sondas TaqMan® correspondientes a 4 de los 96 oligos que componen la membrana de microarray: *BCL2L1*, *FOS*, *MDM2* y *TIMP1* (Applied Biosystems). Durante el proceso se adquiere la emisión resultante de la ruptura de las sondas TaqMan® en presencia de la secuencia diana. Los datos de fluorescencia son analizados con el software SDS para obtener los diferentes valores de expresión relativa.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MICROARRAYS

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa *BRB Array Tools* desarrollado por Dr. Richard Simon y Amy Peng Lam, de la división de tratamiento y diagnóstico de cáncer, del centro de investigación biométrica del instituto nacional de cáncer (USA) (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>).

3.6.1. NORMALIZACIÓN

Se utilizó una normalización global para centrar la mediana del logaritmo en base 2 de los volúmenes en cada membrana para ajustar las diferencias de intensidad en los marcajes. Se utilizó la expresión de los genes constitutivos para realizar la normalización interna de cada membrana.

3.6.2. FILTRADO

Los genes que mostraron una variación mínima en el grupo de membranas fueron excluidos del análisis. Los genes cuya expresión difería al menos 1.5 veces de la mediana en al menos 20% de las muestras fueron analizados.

3.6.3. COMPARACIÓN DE CLASES Y SAM (*Significative Analysis of Microarrays*)

Para encontrar genes con expresión diferencial entre dos clases se utilizó el t -test con varianza aleatoria (F -test para más de dos clases), lo que permite compartir información entre genes acerca de la variación intra-clase sin asumir que todos los genes tienen la misma varianza (Wright and Simon 2003). Los genes fueron considerados estadísticamente significativos si su valor p era menor de 0.001, estableciendo un umbral de significación restrictivo para limitar el número de falsos positivos encontrados. También se realizó un test global para saber cuándo los perfiles de expresión diferían entre las clases, utilizando una permutación de los niveles para los que cada array pertenece a cada clase. Para cada permutación, los valores p fueron re-calculados y el número de genes significativos a nivel 0.001 fue establecido. La proporción de permutaciones que da al menos tantos genes significativos como los datos utilizados fue el nivel de significación del test global.

También se utilizó un test de permutación multivariante (SAM) para conseguir que la mediana de la proporción de falsos descubrimientos no superara el 10% (Simon and Dobbin 2003). La proporción de falsos descubrimientos es la proporción de la lista de genes encontrados diferencialmente expresados y que son falsos positivos. El test estadístico utilizado fue el estadístico t de varianza aleatoria para cada gen. A pesar que el estadístico t fue utilizado, el test de permutación multivariante es no-paramétrico y no requiere asumir que las distribuciones sean de tipo gaussiano.

3.6.4. ANÁLISIS DE VARIABLES CUANTITATIVAS

Para encontrar genes con expresión significativamente relacionada con la edad del paciente, se calculó el nivel de significación estadística para cada gen, para probar la hipótesis de que la correlación de Spearman entre la expresión génica y la edad era cero. Estos valores p fueron entonces utilizados en un test de permutación multivariante para obtener con un 90% de confianza que la proporción de falsos descubrimientos fuera menor al 10% (Simon and Dobbin 2003).

3.6.5. PREDICCIÓN DE CLASES

Se desarrollaron modelos basados en los perfiles de expresión génica para predecir la clase de futuras muestras. Los modelos se desarrollaron basándose en el “*Compound Covariate Predictor*” (Radmacher, McShane, and Simon 2002), “*Diagonal Linear Discriminant Analysis*” (Dudoit and Fridlyand 2002), “*Nearest Neighbor Classification*” (Dudoit and Fridlyand 2002) y “*Support Vector Machines with linear kernel*” (Ramaswamy et al. 2001). Los modelos incorporan genes con expresión diferencial a nivel 0.001 con el t -test de varianza aleatoria. Se estimó el error de predicción de cada modelo utilizando la validación LOOCV (leave-one-out cross-validation) (Simon et al. 2003b). Para cada grupo de prueba LOOCV, el proceso de construcción del modelo fue repetido, incluyendo el proceso de selección de genes. También se evaluó cuándo la proporción validada de error estimado para un modelo era significativamente menor de la esperada por predicción aleatoria. Las clases fueron aleatoriamente permutadas y el proceso LOOCV fue repetido. El nivel de significación es la proporción de permutaciones aleatorias que da una proporción validada de error no superior que la proporción validada de error obtenida con los datos reales. Se utilizaron 1000 permutaciones aleatorias.

3.6.6. REPRODUCIBILIDAD Y SIGNIFICACIÓN DE CLUSTER

Se utilizó un cluster jerarquizado para clasificar las muestras y se utilizó una medición de reproducibilidad (R) para evaluar la fortaleza de la clasificación (McShane et al. 2002). La medida R se basa en la perturbación de los datos de expresión con ruido gaussiano, re-clasificación y medida de la similitud de las nuevas clasificaciones con las originales. Esto se realiza 100 veces. Para cada par de muestras en un cluster de los datos originales, la medida R es la proporción del tiempo que permanecen en el mismo cluster después de la perturbación y la re-clasificación. La medida R es expresada por cada cluster original como una media de todos los pares de muestras y todas las perturbaciones y re-clasificaciones. La varianza utilizada para el ruido gaussiano fue la media de la varianza de los logaritmos de las señales sobre el grupo de muestras, la mediana obtenida de los genes. Se utilizó un cluster jerarquizado para clasificar las muestras y se utilizó una medición de discrepancia (D) para evaluar la fortaleza de la clasificación (McShane et al. 2002), igual que se hizo con R , cada cluster C en los datos originales tiene un cluster diana $T(C)$ en los datos perturbados, que es el más similar. La medida D indica el número de muestras en C pero no en $T(C)$ y el número de muestras en $T(C)$ pero no en C para cada cluster C en los datos originales, promediado sobre todas las repeticiones perturbadas y re-clasificadas.

3.6.7. ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA (OG)

Se identificaron los grupos ontogenéticos de genes cuya expresión estaba diferencialmente regulada entre las clases. Analizando los grupos OG, en vez de los genes individuales, se reduce el número de test realizados y permite hallazgos entre genes biológicamente relacionados que se modulan entre ellos mismos. Para cada grupo OG se calculó el número n de genes representados en el microarray para ese grupo, y el valor p_i de significación estadística para cada gen i en el grupo. Estos valores p reflejan el valor diferencial entre clases y fueron calculados basándose en t -test o F -test de varianza aleatoria (Wright and Simon 2003). Para un grupo OG, se calculan dos estadísticos que representan los valores p para genes en el grupo (estadísticos Fisher y Kolmogorov-Smirnov). Muestras de n genes son aleatoriamente seleccionados de genes representados en el array y el estadístico calculado para esas muestras aleatorias. El nivel de significación asociado con la categoría OG es la proporción de muestras aleatorias dando un valor del estadístico calculado tan amplio como los n genes de la categoría OG. Se considera una categoría OG

regulada diferencialmente de forma significativa si cualquiera de los dos niveles de significación es menor a 0.01. Se consideraron todas las categorías OG que tenían entre 5 y 100 genes representados en el array. Algunas categorías se superpusieron.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS MUTACIONAL DE *NF2*

Para realizar el análisis mutacional del gen *NF2* se amplificaron sus exones por medio de PCR. Posteriormente se analizaron los amplicones por SSCP y dHPLC para detectar variaciones de movilidad y/o formación de heterodúplex. Las muestras con patrones diferentes a los controles fueron secuenciadas para determinar las alteraciones correspondientes. Se identificaron 26 mutaciones en las 68 muestras tumorales analizadas, tal como se muestra en la **Tabla 4.1**. Del total de los 42 meningiomas estudiados, 4 (9.5%) presentaron pequeñas deleciones (de hasta 50kb), pequeñas inserciones 3 de ellos (7.1%), mutaciones sin sentido 4 (9.5%), mutaciones de “splicing” 4 (9.5%) y cambios de secuencia intrónica 3 (7.1%) de ellos, representando en conjunto el 42.9% (18/42) de los meningiomas. Del total de 23 schwannomas estudiados, 2 (8.7%) presentaron pequeñas deleciones, mutaciones sin sentido 2 (8.7%) de ellos, mutaciones de “splicing” 2 (8.7%) y cambios de secuencia intrónica 1 (4.3%) de ellos, representando en conjunto el 34.8% (8/23) de los schwannomas. (**Figura 4.1**.)

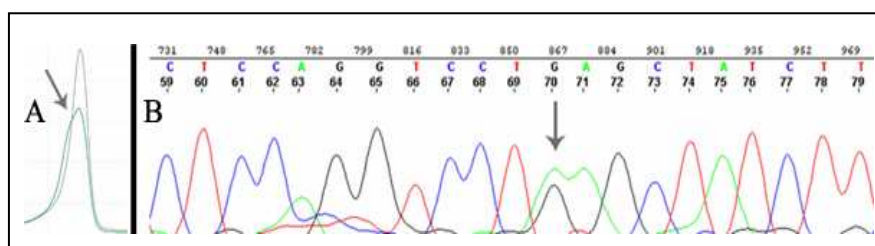


Figura 4.1. (A) Ejemplo de alteración en el patrón de retención por dHPLC y (B) secuencia R del exón 7 en la muestra M13. El doble pico G/A corresponde a la mutación g.1057C>T_p.Gln212Stop.

De estas alteraciones, únicamente la mutación sin sentido g.592C>T - arg57stop ha sido previamente descrita (Rouleau et al. 1993c). La alteración intrónica IVS4+47delA se halló en 2 muestras de meningioma y una de schwannoma y la mutación de “splicing” IVS8+2T>G fue detectada en 3 muestras de meningioma y una de schwannoma, así como en sus correspondientes muestras de ADN de sangre periférica, excepto para uno de los meningiomas. Ninguna otra alteración fue detectada en más de una muestra tumoral.

Tabla 4.1. Resumen de las muestras tumorales analizadas y las alteraciones moleculares encontradas.

ID	GRADO	EDAD	SEXO	Alteraciones NF2 Tumor (NM_000268)	Alteraciones NF2 Sangre (NM_000268)	LOH	PÉRDIDA DE NF2 POR MLPA	GANANCIAS POR MLPA	PÉRDIDAS POR MLPA	METILACIÓN POR MLPA
M01	I	70	F	-	-	-	- / -	-	-	-
M02	I	53	F	-	-	-	- / -	9q34.1 • 11p12 • 10q23.31 • 12q24.33	6q25.2-q27	-
M03	II	19	M	-	-	+	- / +	1p36 • 9q34.1 • 12q24.33	14q24.3	-
M04	II	-	M	-	-	+	- / +	5q31 • 12q24.33	4q35	-
M05	I	-	F	-	-	+	- / +	-	-	-
M06	I	-	F	-	-	-	- / -	1p36 • 9q34.1 • 12q24.33	14q24.3	-
M07	I	-	F	NC_000022.9:g.57597C>T (IVS8-33C>T)	NC_000022.9:g.57597C>T (IVS8-33C>T)	+	- / +	1p36 • 9q34.1 • 12q24.33	14q24.3	CDH13
M08	I	-	F	-	-	-	- / -	1p36 • 9q34.1 • 12q24.33	-	-
M09	I	-	M	-	-	-	- / -	1p36 • 9q34.1	6q25.2-q27	-
M10	I	-	F	-	-	-	- / -	1p36 • 9q34.1 • 12q24.33	-	-
M11	I	-	M	-	-	+	- / +	12q24.33	-	IGSF4
M12	I	-	F	-	-	+	- / +	1p36 • 9q34.1 • 10q23.31 • 12q24.33	-	-
M13	I	-	F	g.1057C>T - p.Gln212Stop	-	-	- / exon 1-6	1p36 • 8q24 • 10q23.31	-	-
M14	I	38	M	NC_000022.9:g.57766T>G (IVS8+2T>G)	NC_000022.9:g.57766T>G (IVS8+2T>G)	+	- / +	8q24	-	-
M15	I	38	M	NC_000022.9:g.57766T>G (IVS8+2T>G)	NC_000022.9:g.57766T>G (IVS8+2T>G)	+	- / +	1p36	-	-
M16	R/I	69	F	NC-000022.9:g.38750delA (IVS4+47delA)	-	+	- / +	8q24	1p36 • 6q25.1-q27	CDKN2B
M17	I	33	F	NC-000022.9:g.38750delA (IVS4+47delA)	-	+	+ / exon 2-8	8q24 • 15q24.3	6q26	-
M18	I	61	F	g.1732insTG	-	+	- / +	-	1p36	CDKN2B
M19	II	76	M	-	-	-	- / -	-	6q26	-
M20	II	71	F	-	-	+	- / +	15q24.3	1p36 • 6q26 • 14q13 • 14q24.3	CDKN2B
M21	R/I	67	M	NC-000022.9:g.54688G>A (IVS7+1G>A)	-	+	- / +	-	1p36 • 6q26	-
M22	I	49	F	g.628A>T - p.Lys69stop	-	+	- / +	8q24	14q13	-
M23	II	63	M	g.1393C>T - p.Gln324Stop	-	+	- / +	-	1p36 • 6q25.1-q27 • 14q13 • 14q24.3	-
M24	II	81	M	NC_000022.9:g.57766T>G (IVS8+2T>G)	-	+	- / +	-	1p36 • 6q25.1 • 14q13	RASSF1
M25	I	37	F	-	-	-	- / -	-	-	-
M26	I	55	F	-	-	+	- / +	-	-	-
M27	I	66	F	g.578_589del	-	+	- / +	-	14q13	RASSF1
M28	I	54	M	-	-	-	- / -	17q21	1p36 • 6q25.1-q27 • 10q23.31	-
M29	I	60	M	-	-	+	- / +	-	-	-
M30	I	65	F	-	-	+	- / +	-	-	-
M31	I	-	F	-	-	+	- / +	-	10q23.31	CASP8 - RASSF1
M32	I	74	F	g.1211delA	-	+	- / +	-	-	-
M33	I	44	F	g.1438_1442del	-	+	- / +	2q14.2 • 9q34.1 • 17q21	1p36 • 6q25.2-q27 • 10q23.31 • 14q24.3	-
M34	I	78	F	g.1747G>T - p.Glu442Stop	-	+	- / +	-	14q13 • 14q24.3	-
M35	I	46	F	g.1389_1399del	-	+	- / +	12q24.33	6q25.2-q27 • 10q23.31 • 14q24.3	CDKN1B
M36	I	61	F	-	-	-	- / exon 1-4	12q24.33 • 17q21	2q14.2	CDKN2B
M37	R/I	76	F	g.1924insC	-	+	- / +	5q31.1	-	-
M38	I	60	M	-	-	-	- / -	-	-	-
M39	I	-	-	-	-	-	- / exon 1-12	-	-	RASSF1
M40	I	50	F	-	-	-	- / -	-	-	-
M41	R/I	55	F	g.988insA	-	+	- / +	-	-	-
M42	I	70	F	-	-	-	- / exon 9-10	4q35 • 10q23.31	1p36 • 8q24 • 09q21.3	-

Tabla 4.1. Continuación. Resumen de las muestras tumorales analizadas y las alteraciones moleculares encontradas.

ID	GRAD O	EDA D	SEX O	Mutaciones NF2 Tumor (NM_000268)	Mutaciones NF2 Sangre (NM_000268)	LO H	PÉRDIDA DE NF2 POR MLPA	GANANCIAS POR MLPA	PÉRDIDAS POR MLPA	METILACIÓN POR MLPA
S01	I	-	M	-	-	-	- / -	1p36 • 10q23.31 • 12q24.33	-	PTEN
S02	I	-	M	-	-	-	- / -	10q23.31 • 12q24.33	-	-
S03	I	-	F	-	-	-	- / -	12q24.33	14q24.3	-
S04	I	-	M	-	-	+	- / +	1p36 • 9q34.1 • 10q23.31 • 12q24.33	14q13	CHFR
S05	I	-	M	-	-	-	- / -	8q24 • 12q24.33	14q24.3	-
S06	I	-	M	-	-	-	- / -	-	-	-
S07	I	-	M	-	-	-	- / -	1p36 • 9q34.1 • 10q23.31 • 12q24.33	17q21	-
S08	I	54	M	NC-000022.9:g.38750delA (IVS4+47delA)	-	-	- / -	-	1p36	-
S09	I	71	F	-	-	-	- / -	-	1p36 • 14q24.3	-
S10	I	59	F	g.1143delG	-	+	- / +	10q23.31 • 12q24.33	-	-
S11	I	38	M	NC_000022.9:g.57766T>G (IVS8+2T>G)	NC_000022.9:g.57766T>G (IVS8+2T>G)	-	- / -	8q24	14q13 • 14q24.3	-
S12	I	-	M	-	-	-	- / -	-	-	-
S13	I	69	M	-	-	-	- / -	12q24.33	-	-
S14	I	55	M	g.780_781del	-	-	- / -	-	-	-
S15	I	56	M	-	-	+	- / +	10q23.31 • 12q24.33	-	-
S16	I	27	F	g.592C>T - arg57stop	-	+	+ / exon 2	-	-	-
S17	I	26	F	-	-	-	- / -	-	-	-
S18	I	49	F	-	-	-	- / -	-	-	-
S19	I	65	M	NC_000022.9:g.71259A>C (IVS13-2A>C)	-	+	- / +	12q24.33	6q26	-
S20	I	14	M	-	-	-	- / -	12q24.33	-	-
S21	I	37	F	-	-	-	- / -	-	-	-
S22	I	55	F	g.782T>A - leu120stop	-	+	- / +	-	-	-
S23	I	62	F	-	-	+	- / +	-	-	-

4.2. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD EN 22q

El análisis de LOH se realizó en las 65 muestras tumorales y sangres periféricas correspondientes. En el 52.3% (34/65) de las muestras analizadas se detectó LOH en 22q, estando presente en el 53.6% (18/32) de los meningiomas GI, el 83.3% de los meningiomas GII, el 100.0% (4/4) de las recidivas y el 30.4% (7/23) de los schwannomas. (Tabla 4.1.)

4.3. MLPA DEL GEN *NF2*

El análisis por MLPA mostró pérdida completa de un alelo del gen *NF2* en 34 de las 65 (52.3%) muestras estudiadas, entre las cuales, un meningioma mostró también pérdida de los exones 2 al 8 en el otro alelo y en un schwannoma se observó también pérdida del exón 2 en el otro alelo (Figura 4.2.). Estos hallazgos sugieren la presencia de LOH para el brazo largo del cromosoma 22 para estas mismas muestras y, por lo tanto, confirman los resultados obtenidos por dicha técnica de microsatélites. Además de las pérdidas completas, se encontraron pérdidas parciales en un alelo del gen *NF2* en 4 de las 65 (6.15%) muestras estudiadas, todas ellas meningiomas GI.

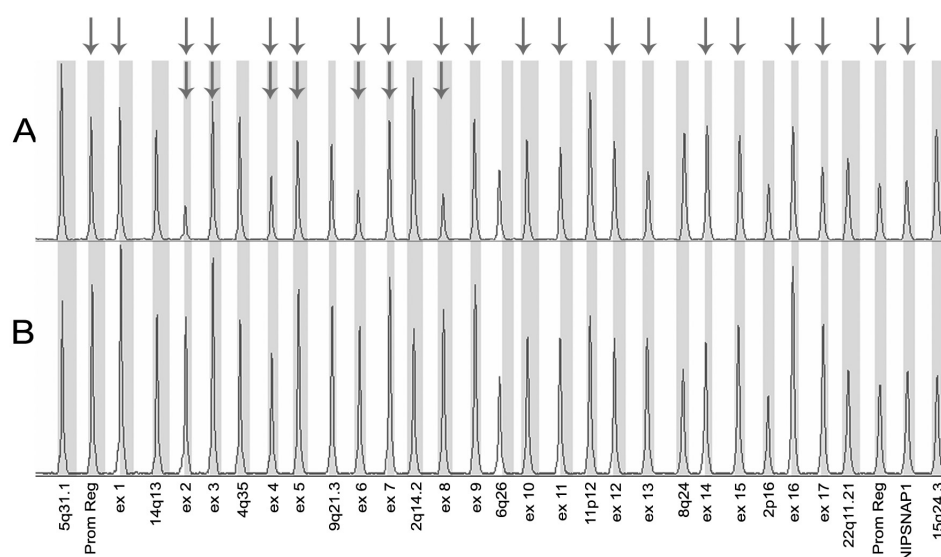


Figura 4.2. Análisis por MLPA del gen *NF2* mostrando la pérdida completa de un alelo y de los exones 2 al 8 en el otro alelo en una muestra de meningioma (A) comparado con una muestra no tumoral (B). Las flechas muestran las sondas con pérdida de uno o dos alelos.

Dentro de las sondas analizadas por MLPA se encontraron duplicaciones frecuentes en 1p36 (20%), 8q24 (10.8%), 9q (16.9%), 10q (15.4%), 12q (33.9%) y 17q (4.6%). En el grupo de las regiones delecionadas, destacan 1p36 (15.4%), 6q25-q27 (21.5%) y 14q (24.6%). (Tabla 4.1.). La sonda 11q23 fue retirada del análisis por presentar una p superior a 0.05 ($p=0.08$).

4.4. MLPA DE METILACIÓN

El análisis por MS-MLPA de 25 genes supresores de tumor mostró alteración en 10 meningiomas y 2 schwannomas, siendo los dos genes más frecuentemente hipermetilados *CDKN2B* y *RASSF1* en 4 muestras cada uno (Figura 4.3.). Los otros genes alterados son *CDH13*, *IGSF4*, *CASP8*, *CDKN1B*, *PTEN* y *CHFR*, cada uno hipermetilado en una muestra.

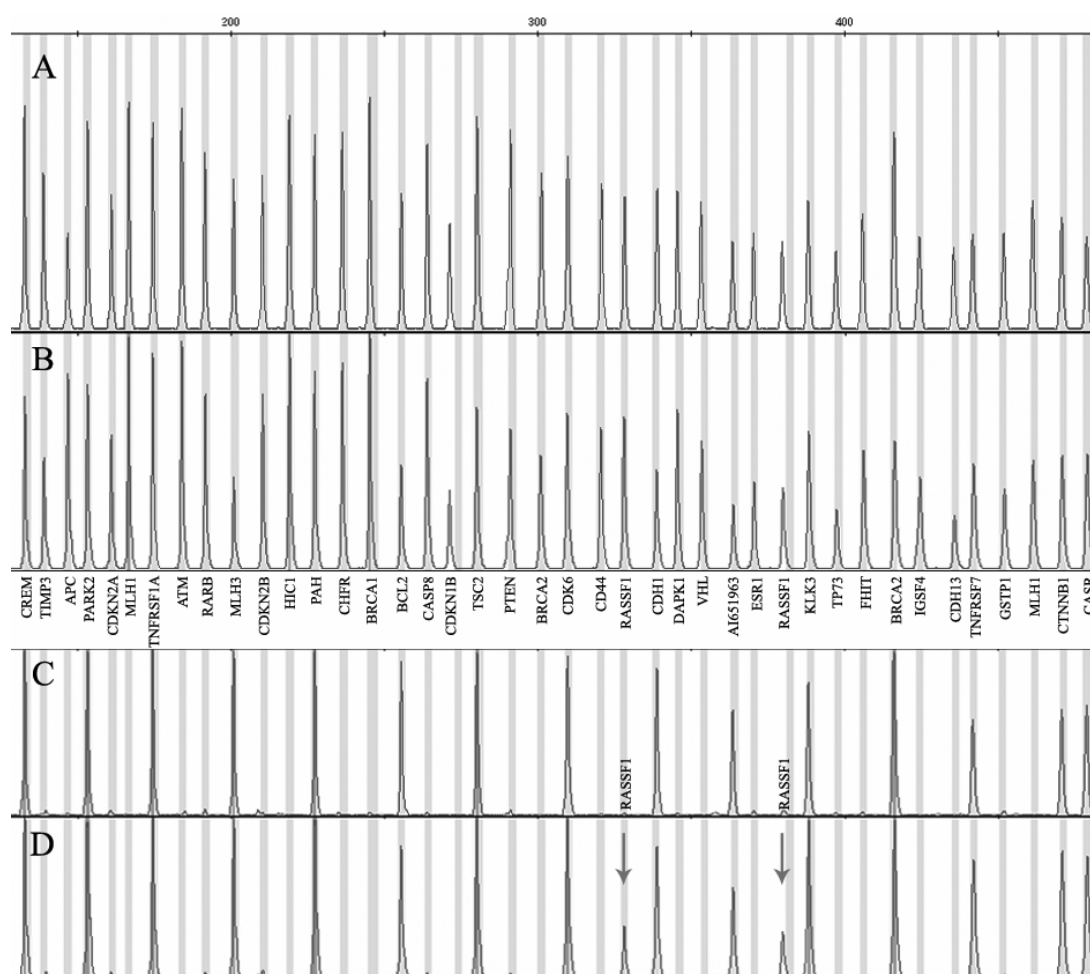


Figura 4.3. Análisis por MS-MLPA mostrando ausencia de pérdidas o ganancias de 40 genes en una muestra de meningioma (B) comparado con una muestra control (A). Se observa hipermetilación para el gen *RASSF1* (D) en esa misma muestra tumoral, comparado con la muestra control (C). Las flechas señalan las sondas que han perdido, por una hipermetilación aberrante de la región promotora, el sitio de corte *HhaI* lo que ha permitido su amplificación.

Los genes CASP8 y CDKN1B, que se encuentran representados también en las membranas de microarray, muestran disminución de expresión en las muestras positivas para hipermetilación de sus correspondientes promotores génicos, estableciendo una concordancia esperable de los resultados entre las dos metodologías.

4.5. MICROARRAYS DE EXPRESIÓN

Para garantizar la reproducibilidad de las membranas de microarray se hibridaron por duplicado 4 muestras de ARN tumoral, dos en un mismo experimento y dos en experimentos diferentes. También se hibridaron por duplicado los 3 controles de ARN de meninge. Los datos se han analizado mediante el programa estadístico SAS 9.1, utilizando el coeficiente de correlación intra-clase. En todos los casos estudiados, este coeficiente fue superior a 0.87, con una media de 0.91. Estos datos confirman la reproducibilidad de los resultados obtenidos con el material utilizado.

4.5.1. ANÁLISIS POR CLUSTER

Para encontrar agrupaciones de muestras y genes, por métodos diferentes a aquellos que determinan clases conocidas, se utilizó el método jerarquizado no supervisado por cluster, utilizando el coeficiente de correlación de distancias de Spearman. Se analizaron 96 genes relacionados con vías específicas que intervienen en la génesis y progresión de cáncer, en las 65 muestras tumorales de meningioma y schwannoma y 3 muestras de meninge control con el fin de obtener un patrón visual global de expresión que permitiera diferenciar grupos de genes y grupos de muestras, basándose en sus patrones de expresión génica.

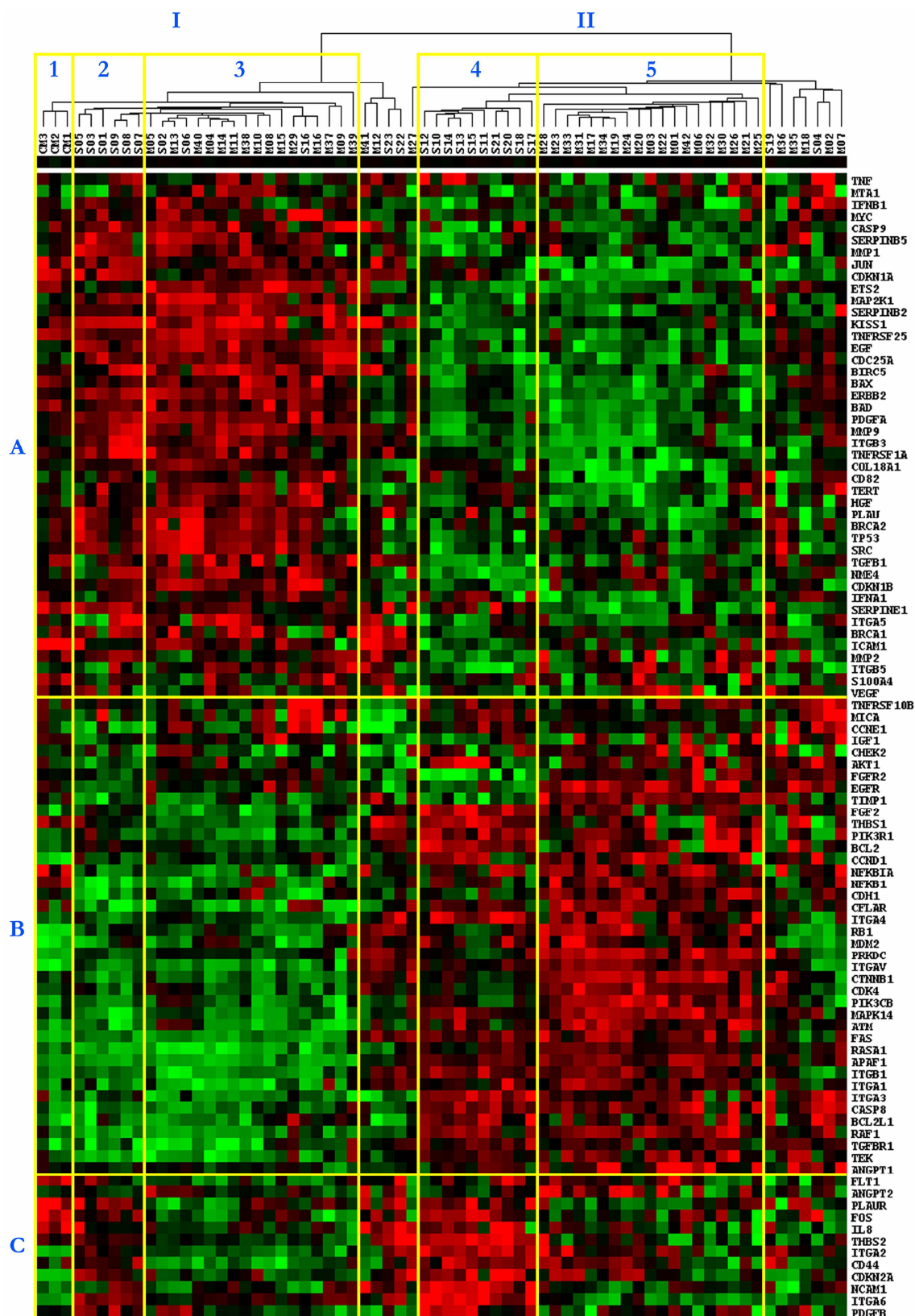


Figura 4.4. Clasificación por cluster jerarquizado de las expresiones relativas de los 96 genes relacionados con cáncer en 3 controles de meninge (CM), 42 meningiomas (M) y 23 schwannomas (S). ■ Mayor y ■ menor expresión relativa.

El análisis mostró 3 grupos de **genes** [A, B y C] y 2 grandes grupos de **muestras** [I y II] a su vez divididos en 3 y 2 subgrupos muestrales [1–3, 4–5] claramente diferenciados, tal como se observa en la **figura 4.4**. El primer grupo de muestras [I] engloba las meninges control [1] y dos subgrupos diferenciados de schwannomas [2] y meningiomas [3]; este último incluye también a 3 schwannomas. El segundo grupo de muestras [II] permite diferenciar también entre meningiomas [5] y schwannomas [4]. También se observan muestras tumorales, tanto en el grupo I como en el grupo II, que no se enmarcan dentro de estos 5 subgrupos al no seguir un patrón similar de expresión en el conjunto de los 96 genes.

Como análisis global, este método no supervisado establece un grupo de muestras en el que se puede diferenciar entre schwannomas y meningiomas con patrón de expresión similar a los controles de meninge [1, 2 y 3] y un grupo de muestras en el que se puede diferenciar entre schwannomas y meningiomas [4 y 5] con patrón de expresión diferente a los controles de meninge.

Como se muestra en la **figura 4.4**, lo que permite discriminar entre los dos tipos tumorales, meningioma y schwannoma, dentro de cada uno de los dos grandes grupos de muestras [I2:I3 y II4:II5], son los últimos 12 genes ilustrados [C] en la parte inferior del cluster [2C:3C y 4C:5C]. Este grupo de genes incluye a *FLT1*, *PLAUR*, *FOS*, *IL8*, *THBS2*, *ITGA2*, *CD44*, *CDKN2A*, *NCAM1* e *ITGA6*, que, como posteriormente se mencionará, forman parte de los genes diferencialmente expresados ($p < 0,001$) entre control de meninge, meningiomas y schwannomas; también incluye a los genes *ANGPT2* y *PDGFA*, que no mostraron diferencias significativas a nivel $p < 0.001$, en el posterior análisis de comparación de clases.

Debido a su importancia ya descrita en meningiomas, schwannomas u otros tumores del sistema nervioso central, del grupo de genes **A** destaca la menor expresión de los genes *JUN*, *CDKN1A*, *ERBB2*, *MMP9*, *SERPINE1* e *ICAM1* en el grupo de muestras **II** comparado con su mayor expresión en el grupo de muestras **I** (figura 4.4.). Por otro lado, en el grupo de genes **B** destaca la mayor expresión de los genes *FGFR2*, *EGFR*, *TIMP1*, *THBS1* e *ITGA3* en el grupo de muestras **II** comparado con su menor expresión en el grupo de muestras **I** (figura 4.4.). Las diferencias de expresión de los genes de los grupos **A** y **B**, son las que permiten establecer dos grupos moleculares de muestras, **I** y **II**, de la misma forma en que los genes del grupo **C**, como se comenta en el párrafo anterior, permiten diferenciar cada uno de los dos tipos tumorales —meningiomas y schwannomas— dentro de cada uno de estos dos grande grupos de muestras.

4.5.2. COMPARACIÓN DE CLASES Y SAM

Se analizaron las expresiones diferenciales de los 96 genes relacionados con cáncer incluidos en las membranas de microarray en 3 muestras de meninge control, 42 meningiomas y 23 schwannomas. Toda comparación entre dos o más clases se realizó tanto por el *t*-test con varianza aleatoria (*F*-test para más de dos clases) como por SAM (significant analysis of microarrays).

COMPARACIÓN ENTRE MENINGE CONTROL Y MENINGIOMA: La comparación entre las muestras de meninge control y los meningiomas mostró 4 genes expresados diferencialmente de manera significativa a nivel 0.001 del test univariado, en el que la probabilidad de encontrar 4 genes significativos por azar (a nivel 0.001), si no hubiera diferencias reales entre las clases (TFS), fue de 0.007. Estos genes son: *FOS*, *ICAM1*, *PLAUR* y *IL8*. Los 4 genes mostraron disminución de expresión en los meningiomas comparados con las muestras de meninge normal.

El análisis por SAM mostró 3 genes adicionales con disminución de expresión con respecto a las muestras control: *FLT1*, *SERPINE1* y *CDKN1A*. Con un percentil 90 de confianza, la razón de falsos descubrimientos (RFD) por SAM entre los 7 genes significativos es de 0.09804. En la Tabla 4.2. se muestra el valor p o los valores de los estadísticos en SAM para cada gen (ordenados alfabéticamente) y las diferencias en número de veces entre las clases (Figura 4.5.).

Tabla 4.2. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE MENINGIOMA Y CONTROL DE MENINGE				
GEN	Expresión global en Meningiomas (1)	Expresión global en Meninge Control (2)	Ratio 1 : 2	p / SAM
<i>CDKN1A</i>	76.0	447.2	-5.9	SAM1
<i>FLT1</i>	34.8	270.1	-7.8	SAM1
<i>FOS</i>	170.7	4195.0	-24.6	$p < 0.001$
<i>ICAM1</i>	3.4	23.5	-6.9	$p < 0.001$
<i>IL8</i>	11.2	137.1	-12.2	$p < 0.001$
<i>PLAUR</i>	38.9	415.1	-10.7	$p < 0.001$
<i>SERPINE1</i>	18.0	119.0	-6.6	SAM1

SAM1: En el percentil 90 de confianza, la tasa de falsos descubrimientos entre los 7 genes significativos es 0,09804. El valor delta usado para identificar los genes significativos es 0,79987. El factor de corrección para la desviación estándar fue calculado como 0,77642.

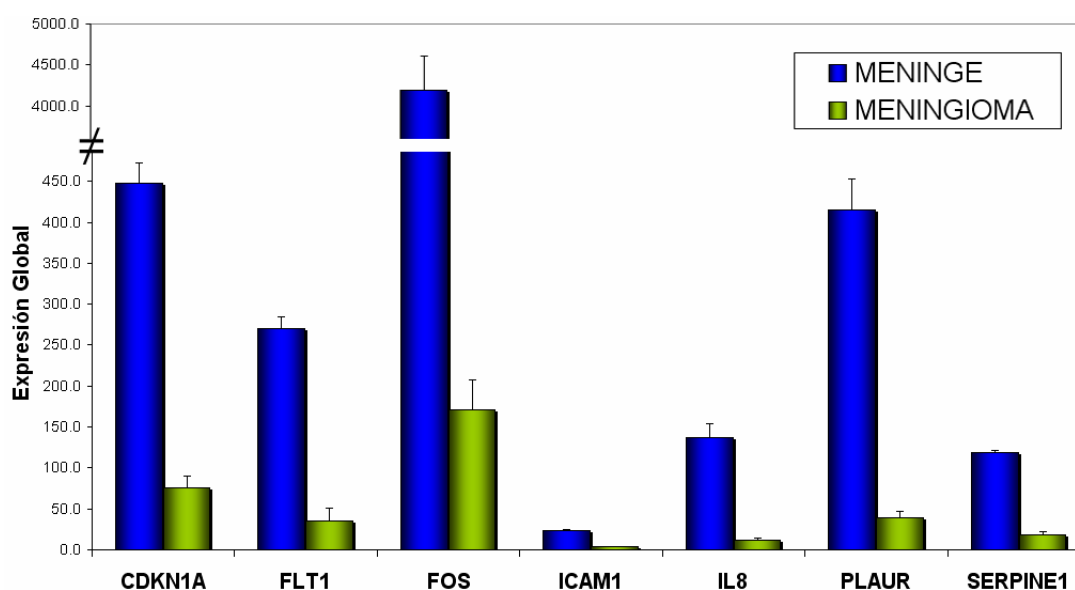


Figura 4.4. Expresión global relativa de los genes diferencialmente expresados entre Meningioma y Control de Meninge.

COMPARACIÓN ENTRE MENINGIOMAS GRUPO I3 Y II5: La comparación de expresión génica, a nivel $p < 0.0001$, entre los controles de meninge y las muestras pertenecientes a los dos grupos de meningiomas encontrados en el análisis por cluster (**I3** y **II5**) mostró 38 genes estadísticamente significativos con una TFS de 0. Los genes (ordenados alfabéticamente) y sus diferencias de expresión se muestran en la **tabla 4.3**. Un segundo análisis por cluster, incluyendo únicamente las muestras pertenecientes a estos dos grupos y los 38 genes diferencialmente expresados, muestra la fuerza de estas dos agrupaciones (**Figura 4.5.1**).

GEN	Expresión global en CM	Expresión global en I3	Expresión global en II5	CM : I3	CM : II5	I3 : II5	<i>p</i>
APAF1	31.8	18.4	362.8	1.7	-11.4	-19.7	$p < 0.0001$
ATM	55.6	52.3	160.3	1.06	-2.9	-3.1	$p < 0.0001$
BAD	171.1	146.8	22.3	1.17	7.7	6.6	$p < 0.0001$
BAX	1100.9	1030.4	146.5	1.07	7.5	7.0	$p < 0.0001$
BIRC5	227.2	426.8	34.9	-1.9	6.5	12.2	$p < 0.0001$
CASP9	3.8	5.0	1.6	0.76	2.4	3.1	$p < 0.0001$
CDC25A	17.7	38.5	7.7	-2.2	2.3	5.0	$p < 0.0001$
CDKN1A	447.2	215.8	35.5	2.1	12.6	6.1	$p < 0.0001$
COL18A1	47.0	51.9	9.3	0.91	5.1	5.6	$p < 0.0001$
CTNNB1	55.0	22.0	270.5	2.5	-4.9	-12.3	$p < 0.0001$
EGF	4.7	11.5	1.9	-2.4	2.5	6.1	$p < 0.0001$
ERBB2	1802.1	3109.2	338.8	-1.7	5.3	9.2	$p < 0.0001$
ETS2	118.3	136.6	31.8	0.87	3.7	4.3	$p < 0.0001$
HGF	15.7	25.6	5.9	-1.6	2.7	4.3	$p < 0.0001$
ICAM1	23.5	5.0	2.7	4.70	8.7	1.9	$p < 0.0001$
IFNA1	312.8	237.9	36.6	1.31	8.5	6.5	$p < 0.0001$
ITGA1	48.8	19.5	161.6	2.5	-3.3	-8.3	$p < 0.0001$
ITGA6	6.4	16.7	4.0	-2.6	1.6	4.2	$p < 0.0001$
ITGAV	5.2	11.6	188.9	-2.2	-36.3	-16.3	$p < 0.0001$
ITGB1	171.9	115.9	601.7	1.48	-3.5	-5.2	$p < 0.0001$
ITGB3	57.5	92.1	14.6	-1.6	3.9	6.3	$p < 0.0001$
JUN	467.5	223.5	70.0	2.1	6.7	3.2	$p < 0.0001$
KISS1	21.3	44.7	3.5	-2.1	6.1	12.8	$p < 0.0001$
MAP2K1	26.9	42.9	13.9	-1.6	1.9	3.1	$p < 0.0001$
MAPK14	23.0	12.6	75.3	1.8	-3.3	-6.0	$p < 0.0001$
MMP9	90.5	190.4	13.6	-2.1	6.7	14.0	$p < 0.0001$
PDGFA	163.0	259.0	42.1	-1.6	3.9	6.2	$p < 0.0001$
PIK3CB	8.9	8.9	27.1	1.00	-3.0	-3.0	$p < 0.0001$
PLAU	33.4	38.3	7.8	0.87	4.3	4.9	$p < 0.0001$
PRKDC	6.6	14.1	51.5	-2.1	-7.8	-3.7	$p < 0.0001$
RAF1	42.5	19.9	129.9	2.1	-3.1	-6.5	$p < 0.0001$
RASA1	155.5	48.3	840.8	3.2	-5.4	-17.4	$p < 0.0001$
SERPINB2	12.7	21.6	4.9	-1.7	2.6	4.4	$p < 0.0001$
SERPINE1	119.0	43.4	8.5	2.7	14.0	5.1	$p < 0.0001$
TIMP1	176.5	93.9	303.3	1.9	-1.7	-3.2	$p < 0.0001$
TNFRSF25	19.4	13.1	2.9	1.48	6.7	4.5	$p < 0.0001$
TNFRSF1A	745.5	817.7	213.0	0.91	3.5	3.8	$p < 0.0001$
TNFRSF6/FAS	27.1	30.3	171.5	0.89	-6.3	-5.7	$p < 0.0001$

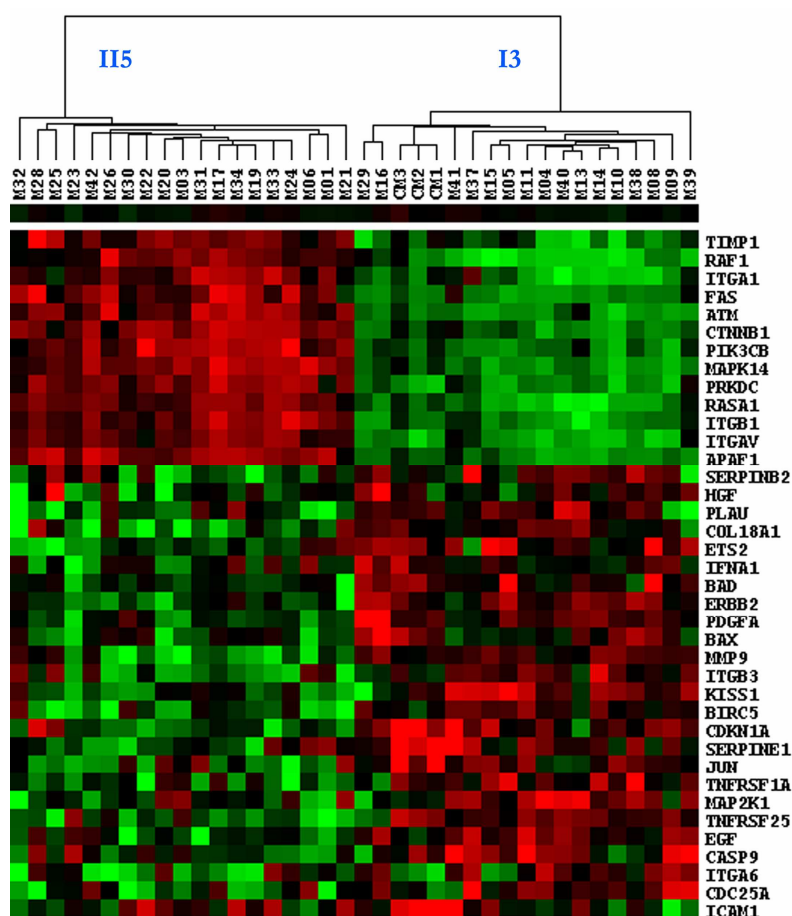


Figura 4.5.1. Clasificación por cluster jerarquizado de las expresiones relativas de los 38 genes diferencialmente expresados entre los controles de meninge (CM) y los meningiomas (M) pertenecientes a los grupos **I3** y **II5**. ■ Mayor y ■ menor expresión relativa. Se observa claramente dos grupos de meningiomas molecularmente diferenciados.

COMPARACIÓN ENTRE GRADOS Y RECIDIVAS EN MENINGIOMA: La comparación de los niveles de expresión génica entre las muestras de meningioma, diferenciándolas por grado tumoral y recidivas (GI, GII y R), mostró 1 gen significativo con una TFS de 0.102. El gen diferencialmente expresado fue *S100A4*, cuya expresión aumentó en las muestras GII con respecto a GI y también en las muestras R con respecto a GII (Tabla 4.4.) (Figura 4.6.). El análisis por SAM mostró 2 genes con disminución en su expresión en las muestras GII con respecto a las muestras GI (*IFNA1* y *MMP9*). (Tabla 4.5.)(Figura 4.6.)

Tabla 4.4. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS POR GRADO Y RECIDIVA EN MENINGIOMAS							
GEN	Expresión global en GI	Expresión global en GII	Expresión global en R	GI : GII	GI : R	GII : R	<i>p</i>
<i>S100A4</i>	30.0	72.0	110.7	-2.4	-3.7	-1.5	<i>p</i> < 0.001

Tabla 4.5. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS POR GRADO I / II EN MENINGIOMAS				
GEN	Expresión global en GI (1)	Expresión global en GII (2)	Ratio 1 : 2	p / SAM
<i>IFNA1</i>	112.6	19.3	5.8	SAM2
<i>MMP9</i>	60.6	10.4	5.8	SAM2

SAM2: En el percentil 90 de confianza, la tasa de falsos descubrimientos entre los 2 genes significativos es 0. El valor delta usado para identificar los genes significativos es 0.69551. El factor de corrección para la desviación estándar fue calculado como 0.50796.

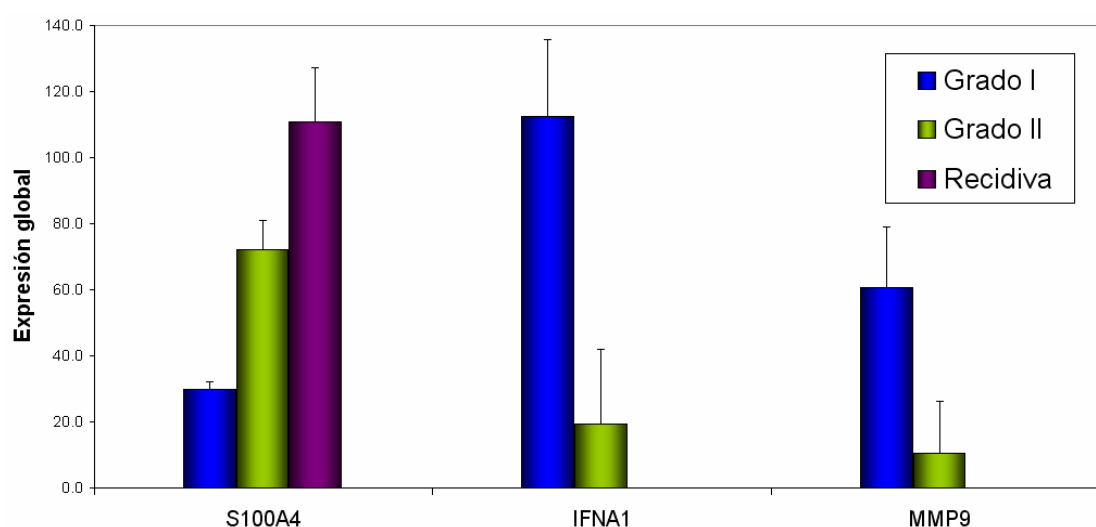


Figura 4.6. Expresión global relativa de los genes diferencialmente expresados por grado y recidiva en Meningiomas.

COMPARACIÓN ENTRE MENINGIOMA Y SCHWANNOMA: La comparación de expresión génica entre las muestras de meningioma y schwannoma mostró diferencias significativas en 14 genes a nivel 0.001, con una TFS de 0. Entre los genes diferencialmente expresados, 11 mostraron menor expresión en los meningiomas con respecto a los schwannomas: *ITGA6*, *THBS2*, *FOS*, *SERPINE1*, *IL8*, *NCAM1*, *ITGA2*, *PLAUR*, *CD44*, *ITGA3* y *CDKN2A*; y 3 genes mostraron mayor expresión en los meningiomas con respecto a los schwannomas: *EGFR*, *TIMP1* y *FGFR2*. El análisis por SAM mostró diferencias significativas en 5 genes adicionales, también con disminución de la expresión en los meningiomas con respecto a los schwannomas: *THBS1*, *PDGFB*, *PLAU*, *CDKN1A* y *COL18A1*. (Tabla 4.6.) (Figura 4.7.)

Tabla 4.6. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE MENINGIOMA Y SCHWANNOMA				
GEN	Expresión global en Meningiomas (1)	Expresión global en Schwannomas (2)	Ratio 1 : 2	p / SAM
CD44	61.0	160.1	-2.6	$p < 0.001$
CDKN1A	76.0	155.3	-2.0	SAM3
CDKN2A	41.4	161.6	-3.9	$p < 0.001$
COL18A1	18.6	37.2	-2.0	SAM3
EGFR	144.2	35.0	4.1	$p < 0.001$
FGFR2	4.8	2.1	2.3	$p < 0.001$
FOS	170.7	666.6	-3.9	$p < 0.001$
IL8	11.2	39.6	-3.5	$p < 0.001$
ITGA2	4.5	14.9	-3.3	$p < 0.001$
ITGA3	105.0	360.6	-3.4	$p < 0.001$
ITGA6	6.9	29.6	-4.3	$p < 0.001$
NCAM1	26.3	75.6	-2.9	$p < 0.001$
PDGFB	3.0	6.1	-2.0	SAM3
PLAU	13.7	30.4	-2.2	SAM2
PLAUR	38.9	113.4	-2.9	$p < 0.001$
SERPINE1	18.0	55.3	-3.1	$p < 0.001$
THBS1	31.6	80.9	-2.6	SAM3
THBS2	22.8	106.9	-4.7	$p < 0.001$
TIMP1	168.0	56.2	3.0	$p < 0.001$

SAM3: En el percentil 90 de confianza, la tasa de falsos descubrimientos entre los 19 genes significativos es 0.08019. El valor delta usado para identificar los genes significativos es 0.88422. El factor de corrección para la desviación estándar fue calculado como 0.28315.

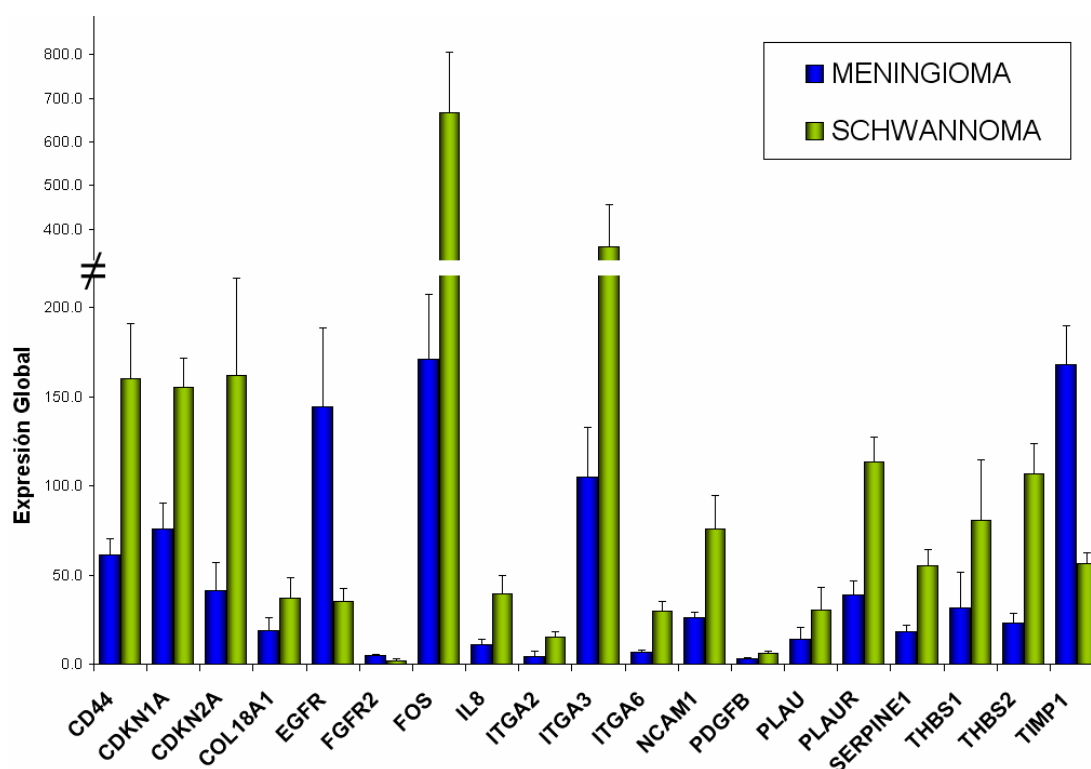


Figura 4.7. Expresión global relativa de los genes diferencialmente expresados entre Meningioma y Schwannoma.

COMPARACIÓN ENTRE SCHWANNOMAS GRUPO I2 Y II4: La comparación de expresión génica entre las muestras de los dos grupos de schwannomas encontrados en el análisis por cluster (I2 y II4) mostró diferencias significativas ($p < 0.0001$) en 20 genes con una TFS de 0 (tabla 4.7.) El análisis por cluster, incluyendo únicamente las muestras pertenecientes a estos dos grupos y los 20 genes, muestra la fuerza de estas dos agrupaciones (Figura 4.7.1.).

Tabla 4.7. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE SCHWANNOMAS GRUPO I2 Y II4				
GEN	Intensidad global en I2	Intensidad global en II4	Ratio I2 : II4	Estadístico p / SAM
APAF1	18.7	368.3	-19.6	$p < 0.0001$
CASP8	14.0	92.6	-6.6	$p < 0.0001$
CFLAR	19.1	78.1	-4.1	$p < 0.0001$
ERBB2	2488.0	715.4	3.5	$p < 0.0001$
FAS	31.6	249.3	-7.9	$p < 0.0001$
FGF2	166.1	861.4	-5.2	$p < 0.0001$
ITGA2	5.3	40.4	-7.6	$p < 0.0001$
ITGA3	81.1	1158.9	-14.3	$p < 0.0001$
ITGA4	6.9	56.6	-8.2	$p < 0.0001$
ITGAV	13.8	105.7	-7.6	$p < 0.0001$
ITGB1	131.4	1065.3	-8.1	$p < 0.0001$
ITGB3	115.1	24.7	4.7	$p < 0.0001$
KISS1	36.5	3.2	11.4	$p < 0.0001$
MAPK14	7.9	56.7	-7.2	$p < 0.0001$
MMP2	205.4	55.4	3.7	$p < 0.0001$
MMP9	128.1	20.9	6.1	$p < 0.0001$
RASA1	37.3	772.0	-20.8	$p < 0.0001$
TEK	11.9	162.7	-13.7	$p < 0.0001$
TGFB1	52.8	25.7	2.1	$p < 0.0001$
THBS2	47.5	299.7	-6.3	$p < 0.0001$

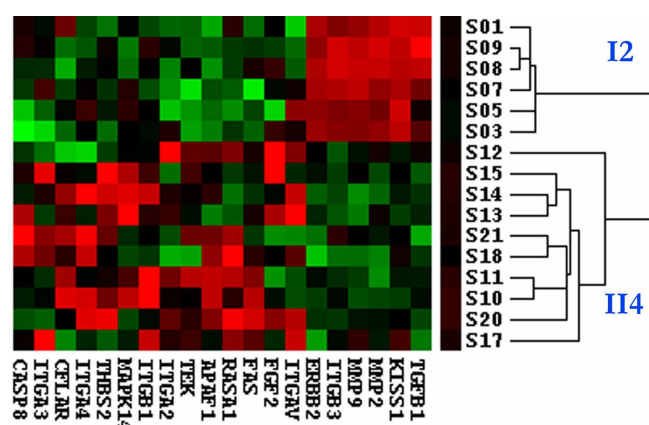


Figura 4.7.1. Clasificación por cluster jerarquizado de las expresiones relativas de los 20 genes diferencialmente expresados entre los schwannomas (S) pertenecientes a los grupos I2 y II4. ■ Mayor y ■ menor expresión relativa. Se observa claramente dos grupos de schwannomas molecularmente diferenciados.

COMPARACIÓN POR PRESENCIA O AUSENCIA DE LOH PARA 22q: La comparación conjunta de la expresión génica en meningiomas y schwannomas, clasificándolos por presencia o ausencia de

LOH para 22q, mostró diferencias ($p < 0.0001$) en 4 genes (TFS de 0.01). Los 4 genes (*CHEK2*, *COL18A1*, *FLT1* y *PLAUR*) mostraron menor expresión en las muestras con LOH. El análisis por SAM mostró 11 genes adicionales con disminución de la expresión en las muestras con LOH: *CDKN1A*, *ERBB2*, *FOS*, *ITGA2*, *ITGA6*, *ITGB3*, *MMP9*, *NCAM1*, *SERPINE1*, *THBS2* y *TNF*. (Tabla 4.8.) (Figura 4.8.).

GEN	Expresión global en LOH + (1)	Expresión global en LOH - (2)	Ratio 1 : 2	p / SAM
<i>CDKN1A</i>	68.7	159.5	-2.3	SAM4
<i>CHEK2</i>	8.7	17.1	-2.0	$p < 0.001$
<i>COL18A1</i>	15.8	38.0	-2.4	$p < 0.001$
<i>ERBB2</i>	705.0	1600.6	-2.3	SAM4
<i>FLT1</i>	26.3	75.6	-2.9	$p < 0.001$
<i>FOS</i>	189.9	511.6	-2.7	SAM4
<i>ITGA2</i>	4.6	9.2	-2.0	SAM4
<i>ITGA6</i>	7.2	17.5	-2.4	SAM4
<i>ITGB3</i>	26.4	58.2	-2.2	SAM4
<i>MMP9</i>	33.3	71.2	-2.1	SAM4
<i>NCAM1</i>	25.7	56.3	-2.2	SAM4
<i>PLAUR</i>	42.3	90.9	-2.1	$p < 0.001$
<i>SERPINE1</i>	19.4	42.0	-2.2	SAM4
<i>THBS2</i>	28.4	57.9	-2.0	SAM4
<i>TNF</i>	10.2	22.2	-2.2	SAM4

SAM4: En el percentil 90 de confianza, la tasa de falsos descubrimientos entre los 15 genes significativos es 0.08654. El valor delta usado para identificar los genes significativos es 0.65722. El factor de corrección para la desviación estándar fue calculado como 0.49088.

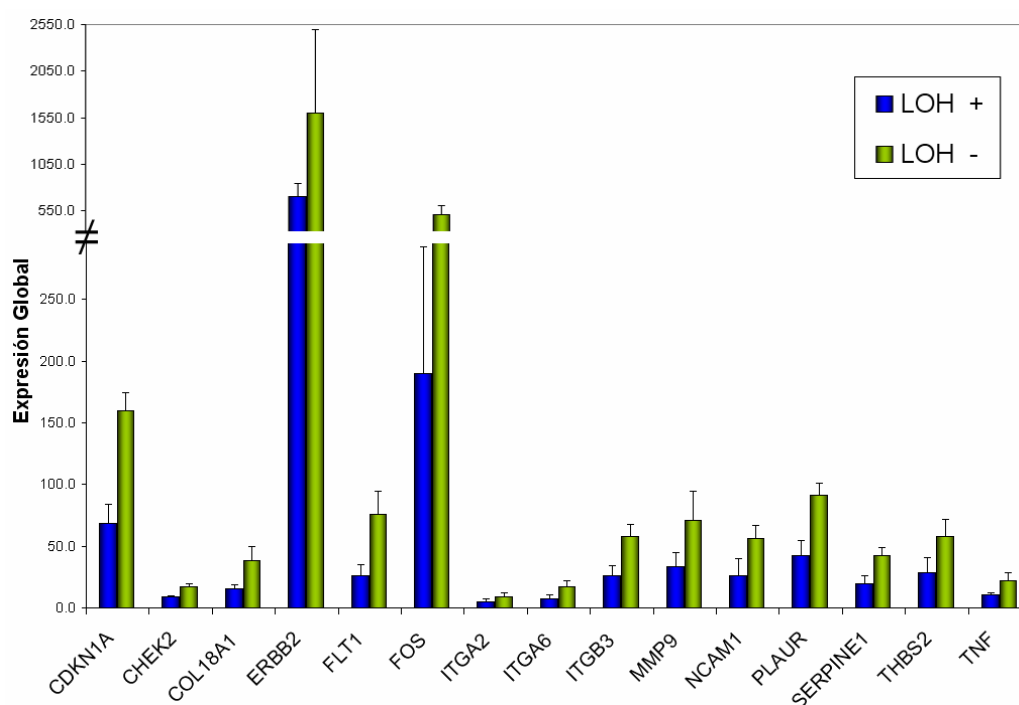


Figura 4.8. Expresión global relativa de los genes diferencialmente expresados por presencia o ausencia de LOH para 22q.

COMPARACIÓN POR PRESENCIA O AUSENCIA DE ALTERACIÓN EN *NF2* POR MLPA: La comparación de los niveles de expresión génica en las muestras de meningioma y schwannoma en forma conjunta, clasificándolas según presentaran pérdidas parciales o totales del gen *NF2* por MLPA, mostró diferencias significativas en 2 genes ($p < 0.001$), con una TFS de 0.02. Estos genes diferencialmente expresados (*FLT1* y *PLAUR*) mostraron menor expresión en las muestras con pérdida de *NF2* por MLPA. El análisis por SAM mostró 9 genes adicionales con disminución de expresión en las muestras con pérdida de *NF2* por MLPA (*CDKN1A*, *COL18A1*, *FOS*, *ITGA3*, *ITGA6*, *NCAM1*, *SERPINE1*, *THBS2* y *TNF*). No se encontraron genes diferencialmente expresados según la presencia de pérdidas parciales o totales del gen *NF2* por MLPA que pudieran diferenciar entre los meningiomas y los schwannomas. (Tabla 4.9.) (Figura 4.9.)

GEN	Expresión global en MLPA + (1)	Expresión global en MLPA - (2)	Ratio 1 : 2	p / SAM
<i>CDKN1A</i>	71.0	171.3	-2.4	SAM5
<i>COL18A1</i>	17.1	38.7	-2.3	SAM5
<i>FLT1</i>	28.7	77.6	-2.7	$p < 0.001$
<i>FOS</i>	203.3	535.7	-2.6	SAM5
<i>ITGA3</i>	113.7	257.6	-2.3	SAM5
<i>ITGA6</i>	7.4	19.1	-2.6	SAM5
<i>NCAM1</i>	26.2	60.9	-2.3	SAM5
<i>PLAUR</i>	38.9	112.1	-2.9	$p < 0.001$
<i>SERPINE1</i>	20.1	44.5	-2.2	SAM5
<i>THBS2</i>	26.8	68.7	-2.6	SAM5
<i>TNF</i>	10.5	23.5	-2.2	SAM5

SAM5: En el percentil 90 de confianza, la tasa de falsos descubrimientos entre los 11 genes significativos es 0.07059. El valor delta usado para identificar los genes significativos es 0.84663. El factor de corrección para la desviación estándar fue calculado como 0.30489.

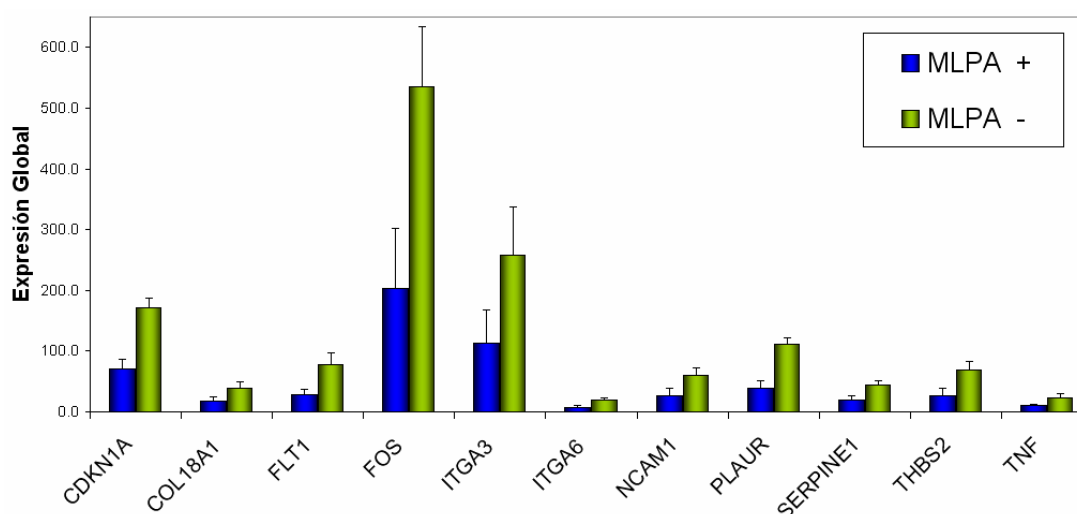


Figura 4.9. Expresión global relativa de los genes diferencialmente expresados por presencia o ausencia de alteración de *NF2* por MLPA.

COMPARACIÓN POR PRESENCIA O AUSENCIA DE MUTACIÓN EN *NF2*: El reducido número de muestras en las que se encontró este tipo de alteración no permitió el análisis estadísticamente significativo de la expresión génica en las muestras tumorales.

COMPARACIÓN POR PRESENCIA O AUSENCIA DE CUALQUIER TIPO DE ALTERACIÓN EN *NF2* (LOH, MLPA y/o análisis mutacional): La comparación de los niveles de expresión génica en las muestras de meningioma y schwannoma en forma conjunta, clasificándolas según presencia o ausencia de cualquier tipo de alteración en el gen *NF2* (LOH, MLPA y/o análisis mutacional), mostró 1 gen significativo (FIS de 0.058). Este gen diferencialmente expresado, *PLAUR*, tenía una menor expresión en las muestras con alteración en el gen *NF2*. El análisis por SAM detectó 2 genes adicionales con disminución de expresión en las muestras con *NF2* alterado (*CDKN1A* y *FLT1*). No se encontraron genes diferencialmente expresados que pudieran diferenciar entre los meningiomas y los schwannomas. (Tabla 4.10.) (Figura 4.10.)

Tabla 4.10. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS POR PRESENCIA O AUSENCIA DE CUALQUIER TIPO DE ALTERACIÓN EN <i>NF2</i>				
GEN	Expresión global en <i>NF2</i> + (1)	Expresión global en <i>NF2</i> - (2)	Ratio 1 : 2	<i>p</i> / SAM
<i>CDKN1A</i>	73.7	172.9	-2.3	SAM6
<i>FLT1</i>	30.1	78.2	-2.6	SAM6
<i>PLAUR</i>	40.4	114.3	-2.8	$p < 0.001$

SAM6: En el percentil 90 de confianza, la tasa de falsos descubrimientos entre los 3 genes significativos es 0. El valor delta usado para identificar los genes significativos es 0.79329. El factor de corrección para la desviación estándar fue calculado como 0.29078.

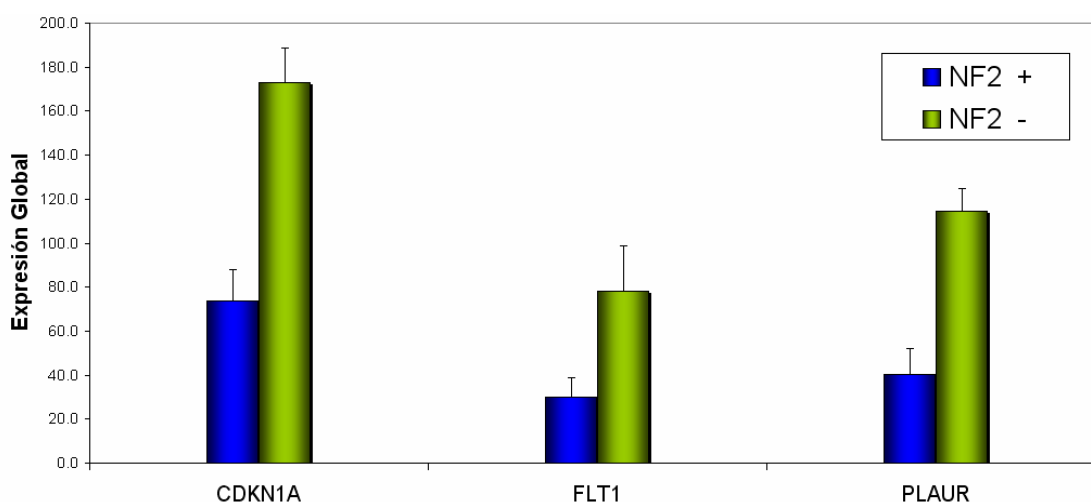


Figura 4.9. Expresión global relativa de los genes diferencialmente expresados por presencia o ausencia de cualquier tipo de alteración de *NF2*.

4.5.3. ANÁLISIS DE VARIABLES CUANTITATIVAS

El cálculo del nivel de significación estadística para variables cuantitativas no mostró ningún gen significativamente asociado con la edad de los pacientes estudiados.

4.5.4. PREDICCIÓN DE CLASES

Para la construcción de predictores se utilizaron los genes diferencialmente expresados entre las clases, escogiendo el nivel de significación optimizado por la tasa de error entre 0.01, 0.005, 0.001 y 0.0005. El método LOOCV se utilizó para calcular la tasa de des-clasificación.

Para una clase A,

n_{11} = número de muestras clase A predichas como A

n_{12} = número de muestras clase A predichas como no-A

n_{21} = número de muestras clase no-A predichas como A

n_{22} = número de muestras clase no-A predichas como no-A

De tal forma que los siguientes parámetros puedan caracterizar la respuesta de los clasificadores:

Sensibilidad = $n_{11}/(n_{11}+n_{12})$

Especificidad = $n_{22}/(n_{21}+n_{22})$

Valor Predictivo Positivo (PPV) = $n_{11}/(n_{11}+n_{21})$

Valor Predictivo Negativo (NPV) = $n_{22}/(n_{12}+n_{22})$

Así, la sensibilidad es la probabilidad de que una muestra clase A sea predicha correctamente como clase A. Especificidad es la probabilidad de que una muestra no clase A sea predicha correctamente como no-A. PPV es la probabilidad de que una muestra predicha como clase A realmente pertenezca a la clase A. NPV es la probabilidad de que una muestra predicha como no clase A realmente no pertenezca a la clase A. Para cada método de clasificación y cada clase, estos parámetros se enumeran a continuación.

Predicción de clases entre Meningioma y Control de Meninge:

Basado en 100 permutaciones aleatorias,

el compound covariate predictor tiene un valor p de 0.03

el linear discriminant analysis classifier tiene un valor p de 0.04

el 1-nearest neighbor classifier tiene un valor p de 0.01

el 3-nearest neighbors classifier tiene un valor p de 0.21

el nearest centroid classifier tiene un valor p de 0.02

el support vector machines classifier tiene un valor p de 0.1

el Bayesian compound covariate classifier tiene un valor p de 0.03

Tasa de Error por Cross-Validation (para el conjunto de niveles de significación y optimizado):

Nivel de significación:	0.01	0.005	0.001	0.0005	Error Optimizado	Nivel óptimo
Compound Covariate Predictor	0.044	0.044	0.067	0.089	0.067	0.005
Diagonal Linear Discriminant Analysis	0.044	0.044	0.067	0.089	0.067	0.005
1-Nearest Neighbor	0.022	0.022	0.067	0.067	0.022	0.005
3-Nearest Neighbors	0.022	0.022	0.067	0.067	0.044	0.005
Nearest Centroid	0.044	0.044	0.044	0.089	0.067	0.001
Support Vector Machines	0.022	0.022	0.067	0.089	0.044	0.005
Bayesian CCP	0.044	0.044	0.067	0.089	0.067	0.005

Comportamiento del Compound Covariate Predictor Classifier:

Clase	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Control de Meninge	1	0.929	0.5	1
Meningioma	0.929	1	1	0.5

Comportamiento del Linear Diagonal Discriminant Analysis Classifier:

Clase	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Control de Meninge	1	0.929	0.5	1
Meningioma	0.929	1	1	0.5

Comportamiento del 1-Nearest Neighbor Classifier:

Clase	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Control de Meninge	0.667	1	1	0.977
Meningioma	1	0.667	0.977	1

Comportamiento del 3-Nearest Neighbors Classifier:

Clase	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Control de Meninge	0.333	1	1	0.955
Meningioma	1	0.333	0.955	1

Comportamiento del Nearest Centroid Classifier:

Clase	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Control de Meninge	1	0.929	0.5	1
Meningioma	0.929	1	1	0.5

Comportamiento del Support Vector Machine Classifier:

Clase	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Control de Meninge	0.333	1	1	0.955
Meningioma	1	0.333	0.955	1

Comportamiento del Bayesian Compound Covariate Classifier:

Clase	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Control de Meninge	1	0.929	0.5	1
Meningioma	0.929	1	1	0.5

Composición del clasificador ordenado por valor t:

Valor p paramétrico	Valor t	Intensidades medias en M	Intensidades medias en S	Ratio de medias	Gen
2.75E-05	4.69	4195	170.7	24.575	FOS
1.49E-04	4.16	23.5	3.4	6.912	ICAM1
6.94E-04	3.66	415.1	38.9	10.671	PLAUR
8.62E-04	3.58	137.1	11.2	12.241	IL8
1.94E-03	3.3	467.5	113.6	4.115	JUN
2.21E-03	3.26	270.1	34.8	7.761	FLT1
4.24E-03	3.02	119	18	6.611	SERPINE1

Los datos obtenidos entre meningioma y control de meninge nos permiten establecer un predictor para clasificar nuevas muestras en una de estas dos clases. Los 7 genes (*FOS*, *ICAM1*, *PLAUR*, *IL8*, *JUN*, *FLT1*, *SERPINE1*), escogidos entre aquellos que presentan una expresión diferencial entre meningiomas y controles de meninge, con un nivel de significación de 0.005, muestran un valor para el estadístico *t* que es el que proporciona el peso de cada uno de los genes dentro del predictor. De esta forma, si se utiliza el discriminador lineal, basado en la fórmula $Z = \sum f_i x_i$, se obtiene el valor *Z* para la media de los controles ($Z_c = \sum f_i x_i$) y el valor *Z* para la media de los meningiomas ($Z_m = \sum f_i x_i$) usados en el análisis. La suma de estos dos valores dividida entre 2 es el valor límite [$C = (Z_c + Z_m) / 2$].

Para este predictor, *C* obtiene un valor de 38.003. Al aplicar esta fórmula a una futura nueva muestra, si el valor *Z_n* obtenido es mayor de 38, se podría predecir que pertenece al grupo de meninge normal y si su valor es inferior, se podría predecir que pertenece al grupo de meningiomas, con la sensibilidad y especificidad anotadas en la tabla anterior. El proceso se repite con la fórmula de cada uno de los clasificadores y se obtiene una probabilidad global de pertenecer a una de las dos clases. Los genes elegidos para formar parte de un predictor no tienen que cumplir, aunque generalmente lo hacen, las exigencias de significación a nivel 0.001 para su expresión diferencial, ya que es la sumatoria de sus pesos específicos, calculando el nivel de error optimizado, lo que da la robustez al clasificador.

4.5.5. ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA (OG)

Se realizó el análisis en un total de 209 categorías OG en BioCarta (www.biocarta.com) y KEGG —*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*— (www.genome.jp/kegg). No se encontró ninguna categoría que tuviera más genes, diferencialmente expresados entre el fenotipo de las clases a nivel nominal 0.005, que los esperados por azar.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los perfiles de expresión génica determinados mediante la técnica de microarrays son un sistema de análisis de alto rendimiento, recientemente utilizado en la investigación básica y aplicada. Proporcionan una gran cantidad de datos, a nivel molecular, que una vez adquiridos, deben ser funcionalmente integrados para encontrar patrones comunes dentro de un grupo definido de muestras biológicas. Además de identificar genes diferencialmente expresados y de establecer patrones de regulación génica, los microarrays nos permiten descubrir nuevos marcadores tumorales que pueden tener un gran impacto en la práctica clínica y la terapéutica del cáncer. Los microarrays pueden ser utilizados como un importante complemento a los métodos diagnósticos convencionales.

En este trabajo hemos utilizado esta metodología emergente para establecer los perfiles de expresión génica de meningiomas y schwannomas. A pesar del actual conocimiento sobre la patogenia molecular de estos dos tipos tumorales, que comparten como característica molecular principal la alteración del gen *NF2*, la falta de datos sobre la historia natural de meningiomas y schwannomas no tratados, el reducido número de pacientes que requieren terapia adicional al tratamiento quirúrgico, así como la falta de líneas celulares y modelos animales fiables y robustos, han limitado hasta ahora el estudio molecular de estas neoplasias.

Como una primera aproximación, se realizó el estudio mutacional del gen *NF2* en las 42 muestras de meningioma y las 23 muestras de schwannoma que conforman la serie tumoral. El porcentaje de muestras estudiadas que presentaron mutación en el gen *NF2* se corresponde con lo ya descrito en la literatura, siendo de un 42.9% para los meningiomas y del 34.8% para los schwannomas analizados. En las alteraciones encontradas, de las que solamente una había sido

descrita con anterioridad (Rouleau et al. 1993c), tanto las mutaciones por pequeñas deleciones como las mutaciones sin sentido representan cada una el 23.1% del conjunto de muestras, cifra similar al 25.5% y 29.2%, respectivamente, de este tipo de alteraciones del gen *NF2* de las que dispone el HGMD —*Human Gene Mutation Data Base*— (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). El grupo de mutaciones por pequeñas inserciones mostró un ligero aumento de frecuencia (11.5%) al compararlo con los datos de este grupo en el HGMD (6.9%).

Cabe destacar por su alta frecuencia la mutación de “splicing” IVS8+2T>G, que fue detectada en 3 muestras de meningioma y 1 de schwannoma (15.38%). El conjunto de mutaciones de este tipo, que impiden la correcta escisión de las regiones intrónicas, representa el 23% de las alteraciones del gen *NF2* en el HGMD. La frecuencia hallada y el hecho de que en 3 de las cuatro muestras, esta mutación se presentara también en el ADN obtenido de linfocitos de sangre periférica, nos hace pensar en la posibilidad de encontramos ante una mutación prevalente que predispone a la aparición del síndrome NF2 y además favorece la aparición de neoplasias aisladas.

El análisis mutacional del gen *NF2* en las 65 muestras estudiadas confirma la alta frecuencia mutacional de este gen en meningiomas y schwannomas y corrobora su importancia como principal gen supresor de tumores involucrado en la génesis de estos dos tipos de neoplasia (Louis et al. 2000a). La mayoría de mutaciones en el gen *NF2* producen una proteína truncada y/o no funcional que le impide actuar como puente regulador entre las proteínas asociadas a membrana y el citoesqueleto de actina, afectando vías metabólicas y de señalización y provocando el desequilibrio que subyace en la patogenia tumoral (McClatchey and Giovannini 2005; Morrison et al. 2001; Xiao et al. 2002). Como ocurre con todos los GST, y de acuerdo a la hipótesis de los dos eventos para el cáncer postulada originalmente para el retinoblastoma (Knudson, Jr. 1971),

las mutaciones suelen acompañarse de otra alteración que afecta al segundo alelo del gen. En la serie estudiada en este trabajo, este segundo evento lo componen las pérdidas totales o parciales del gen o la pérdida de una región del brazo largo del cromosoma 22, que incluye al gen *NF2*.

Mediante el análisis de pérdida de heterocigosidad para la región 22q, que incluye al gen *NF2*, se detectó una frecuencia conjunta de alteraciones en el 52.3% de los casos. Esta frecuencia se encuentra dentro del rango de porcentajes de LOH de 22q ya descritos para estas neoplasias (Louis et al. 2000a). Sin embargo, es en el análisis discriminado donde podemos observar un aumento significativo de esta alteración cuando aumenta la agresividad en muestras de meningioma, ya que está presente en el 53.6% de los meningiomas GI, el 83.3% de los meningiomas GII y el 100.0% de las recidivas de meningiomas GI. Estos datos confirman descripciones previas (Lee et al. 2004), donde se establece la importancia de la pérdida de hetericigosidad —tanto en 22q como en otras regiones cromosómicas—, y que interviene no sólo en la patogénesis sino también en la progresión tumoral de los meningiomas, convirtiéndose así en un significativo marcador pronóstico.

El mecanismo por el que frecuentemente se produce la pérdida específica del cromosoma 22 en meningiomas y schwannomas no se ha establecido. En algunas ocasiones el cromosoma 22 muestra una pérdida completa como la que se esperaría como resultado de una no disyunción mitótica. Sin embargo, en muchos casos las pérdidas en el cromosoma 22 son parciales y pueden deberse a alteraciones estructurales, recombinación mitótica, replicación inducida por rupturas o por conversión génica (Thiagalingam et al. 2002). Los estudios de LOH en tumores permiten establecer regiones específicas de pérdida cromosómica mínima, en las que probablemente se encuentren GST's críticos, y proveen un retrato molecular de los patrones de acumulación de alteraciones genéticas en la progresión escalonada del cáncer. Está claramente establecida la

contribución de la pérdida del gen *NF2* por LOH en la formación de meningiomas y schwannomas. Sin embargo, el gen *NF2* muestra una baja frecuencia de mutaciones comparado con la mayor frecuencia de LOH de 22q (Louis et al. 2007), por lo que en un amplio número de tumores no se produce la inactivación de los dos alelos del gen *NF2* por estos dos mecanismos; además, se han descrito en la literatura meningiomas con deleciones del cromosoma 22 que no incluyen al gen *NF2* (Ruttledge et al. 1994); esto hace pensar que esta región alberga uno o más GST importantes en la tumorigénesis de estas neoplasias.

Otro mecanismo por el que se produce la pérdida de actividad del gen *NF2* es el de su deleción total o parcial. En nuestro estudio, el análisis de grandes deleciones o duplicaciones por la técnica de MLPA confirmó la pérdida completa de un alelo del gen *NF2* en todas aquellas muestras con un resultado positivo para LOH de 22q. Además, se encontraron pérdidas parciales del gen *NF2* en 2 muestras con LOH para 22q y en 4 muestras sin LOH para 22q. En 3 de estas últimas 4 muestras no se encontró ninguna mutación para el gen *NF2*, por lo que podría estar originándose su inactivación por mecanismos alternativos, como puede ser el silenciamiento génico por hipermetilación de promotores.

La técnica de MLPA ha sido utilizada con anterioridad para buscar alteraciones del gen *NF2* en 77 pacientes con neurofibromatosis tipo II, en los que no se pudo encontrar mutaciones ni en ADN de muestras tumorales ni de sangre periférica (Kluwe et al. 2005). Los autores encontraron 14 (18.18%) muestras con deleciones parciales, 5 (6.49%) muestras con deleciones totales y una muestra con duplicación parcial en el gen *NF2*. En un trabajo más reciente hemos estudiado 54 meningiomas esporádicos y familiares, encontrando 26 (48.1%) casos de deleciones totales y 14 (25.9%) casos de deleciones parciales; las deleciones fueron más frecuentes en los meningiomas esporádicos que en los casos familiares (Martínez-Glez et al. 2007). Las deleciones parciales que

se descubren por MLPA no pueden ser detectadas por técnicas convencionales (PCR y secuenciación automática) y, por lo tanto, esta nueva tecnología aumentará el porcentaje de muestras con alteración en el gen *NF2*, tanto para los casos familiares como para los esporádicos.

También se analizaron en las muestras tumorales las pérdidas y ganancias en regiones diferentes a 22q12, utilizando las salsas P044 y ME001 de MLPA. En meningiomas atípicos y anaplásicos está descrita la frecuente pérdida del brazo corto del cromosoma 1 (76%) y del brazo largo del cromosoma 14 (43%), especialmente en tumores agresivos que en su mayoría se acompañan de LOH de 22q (Leone et al. 1999; Weber et al. 1997). Mediante el análisis por MLPA, nuestros resultados muestran pérdidas de 1p36 (15.4%), específicamente en el locus del gen *TP73*, en 2/23 schwannomas y en 8/42 meningiomas —entre los que se encuentran el 3/6 de los meningiomas GII— y pérdidas de 14q (24.6%) en 5/23 schwannomas y en 11/42 meningiomas —entre los que se encuentran el 4/6 de los tumores grado II—; de estas últimas 16 muestras con pérdidas de 14q, solamente 1 schwannoma tiene también LOH de 22q, mientras que sólo en 1 meningioma no se detectó LOH para 22q. También está descrita la frecuente pérdida de 6q (33%) en meningiomas (Weber et al. 1997) y en la serie estudiada encontramos pérdida por MLPA en 6q25.1-q27 en 13 meningiomas y 1 schwannoma (21.5%). Las disminuciones en los porcentajes que hemos obtenido, en relación a los publicados, se pueden atribuir a la composición mayoritariamente de grado I de las muestras estudiadas.

La duplicación de regiones cromosómicas es también un hecho frecuente en meningiomas y schwannomas. Se han descrito frecuencias elevadas de ganancias en 9q (33%), 12q (43%) y 17q21 (33%) en meningiomas atípicos y anaplásicos (Weber et al. 1997). En nuestro estudio se han encontrado igualmente duplicaciones por MLPA en 9q34 (16.9%), 12q24 (33.9%) y 17q21 (4.6%), aunque con frecuencias inferiores a las mencionadas. Adicionalmente, hemos encontrado

duplicaciones en 8q (10.8%) en 5/42 meningiomas y 2/23 schwannomas; esta es la primera descripción de duplicación frecuente de 8q, ya que la única reseña disponible hace referencia a un cariotipo altamente aberrante y cercano a la triploidía en un meningioma maligno recurrente (Pelz et al. 2007).

Otra alteración encontrada en nuestra serie tumoral es la duplicación de 10q23.31 (15.4%) en 4/42 meningiomas y 6/23 schwannomas. La sonda de MLPA utilizada para esta región hibrida específicamente en el locus del gen *PTEN*. Actualmente se reconoce las frecuentes pérdidas de 10q, aunque no se han observado mutaciones o deleciones homocigotas para el gen *PTEN*, por lo que prácticamente se ha descartado su participación en la patogénesis de meningiomas y schwannomas (Bostrom et al. 1998; Peters et al. 1998). Sin embargo, nuestros resultados indican que un porcentaje de las muestras estudiadas presenta duplicación de la región promotora de *PTEN*. Si este dato representa una duplicación de *PTEN* o una ganancia de 10q, sería la primera vez que se describe este fenómeno, contrario al de su usual pérdida. No se puede determinar con las sondas MLPA utilizadas el tamaño de las duplicaciones encontradas en 10q, por lo que no se puede descartar que en esta región se encuentre otro gen que favorezca el proceso tumoral de estas neoplasias.

Los datos obtenidos por MLPA muestran que las pérdidas y ganancias son frecuentes también en las muestras tumorales de grado I y que, aunque su frecuencia aumenta con el grado tumoral, no son exclusivas de las lesiones atípicas y anaplásicas. Consecuentemente, pueden tener un papel importante tanto en estadios iniciales como en la progresión tumoral. Además, la inactivación del gen *NF2* por sí sola no parece tener un papel importante en el desarrollo de malignidad, ya que la mayoría de casos que muestran únicamente esta alteración son clasificados como meningiomas grado I. En su conjunto, la pérdida de otros alelos en 22q así como de otras

regiones cromosómicas, como las comentadas anteriormente y detectadas en este trabajo tanto por análisis de LOH como por MLPA, parecen estar influyendo decisivamente en el proceso multifactorial de progresión tumoral en estas neoplasias.

Un mecanismo de alteración de la expresión génica, alternativo a los cambios de secuencia del ADN anteriormente mencionados, es el silenciamiento por cambios epigenéticos. El estudio de silenciamiento génico por hipermetilación aberrante de regiones promotoras fue positivo en porcentajes similares a los previamente descritos en meningiomas y schwannomas para los genes *CDKN2B* (6.15%) y *RASSF1* (6.15%) (Lassaletta et al. 2006; Liu et al. 2005). El gen *CDKN2B*, un inhibidor de la kinasa dependiente de ciclina, localizado en 9p21, funciona como regulador del crecimiento celular y su silenciamiento favorece la progresión en la fase G1 del ciclo celular y, por lo tanto, contribuye a la supervivencia celular tumoral (Boulton and Wainscoat 2007). El gen *RASSF1* (3p21.3), cuya proteína interviene en la reparación de ADN e inhibe la acumulación de ciclina D1, se ha encontrado frecuentemente silenciado por hipermetilación en una gran variedad de tipos tumorales incluido schwannomas, lo que produce la pérdida de su capacidad para inducir la parada del ciclo celular, favoreciendo así la proliferación tumoral (Hesson, Cooper, and Latif 2007).

El silenciamiento de estos dos genes, además de la presencia de otros 6 genes relacionados con cáncer (*CDH13*, *IGSF4*, *CASP8*, *CDKN1B*, *PTEN* y *CHFR*) que también mostraron cada uno hipermetilación aberrante de sus promotores génicos en una muestra analizada, reafirma que este mecanismo podría contribuir como una vía alternativa a la forma clásica de mutación más delección que lleva a la tumorigénesis y progresión tumoral —hipótesis de los dos eventos de Knudson para la inactivación de GSTs (Knudson, Jr. 1971)—, funcionando como un mecanismo generador de diversidad molecular en las neoplasias, que parece proveer una ventaja selectiva más

sutil que la sola mutación. La metilación está asociada a incrementos graduales de pérdida de transcripción por incremento de la densidad de metilación adquirida en sucesivas replicaciones, y está usualmente asociada a la pérdida de regiones codificantes o mutaciones génicas en el alelo complementario (Esteller 2002). Es importante mencionar que la hipermetilación también ocurre en genes que no son considerados oncosupresores y que en algunos genes la vía epigenética podría ser la única causante de inactivación, ya que para ellos no hay mutaciones descritas o son poco frecuentes (Esteller 2002).

Una vez realizado el análisis mutacional y de metilación, se procedió al estudio en las muestras de meningioma, meninge normal y schwannoma del nivel de expresión de 96 genes asociados con vías biológicas específicas relacionadas con cáncer y conocidos por su implicación oncogénica u oncosupresora en una gran variedad de tipos tumorales. El primer abordaje a la gran cantidad de datos que se obtienen con los microarrays y que ofrece una integración visual e intuitiva de las expresiones globales, es el análisis jerarquizado no supervisado por cluster. Con los datos obtenidos en la serie tumoral estudiada se identificaron claramente dos grandes grupos tumorales y tres grupos de genes, como se ha explicado en los resultados. Lo interesante de esta aproximación, a pesar de no ofrecer genes diferencialmente expresados de forma estadísticamente significativa, es que reduce la multi-dimensionalidad de los resultados y, por lo tanto, permite un manejo más fácil de ellos. Sin embargo, la esencia no determinística de este método nos obliga a complementarlo con otros métodos supervisados. Efectivamente, los resultados obtenidos en este trabajo con métodos de comparación de clases y predictores, no solo reafirman los grupos encontrados por cluster, sino que también nos permiten obtener posibles grupos funcionales para posteriores análisis.

La comparación de los niveles de expresión génica entre las muestras de meninge control y los meningiomas mostró 7 genes diferencialmente expresados: *FOS*, *ICAM1*, *PLAUR*, *IL8*, *FLT1*, *SERPINE1* y *CDKN1A*. La expresión del gen *FOS* (14q24.3) encontrada en las muestras de meninge no tumoral de nuestra serie, 24.6 veces mayor que la media global en los meningiomas, sumado a la actividad oncosupresora del gen *FOS*, evidenciada por su activación mediada por p53 y su capacidad de activar genes reparadores de ADN por medio de la proteína AP-1 (Roos and Kaina 2006), podría implicar que la baja expresión de *FOS* es un componente importante en el proceso tumoral de los meningiomas.

El gen *ICAM-1* (19p13) muestra niveles variables de expresión en diversos tipos de cáncer (Rosette et al. 2005). En la serie estudiada, este gen se expresa 6.9 veces menos en meningiomas que en las muestras de meninge control. Ya que la sobre-expresión de este gen, a través de la cascada de señalización de NFK- β o directamente por p53, es importante en el proceso de senescencia celular (Kletsas et al. 2004), su regulación negativa en las muestras estudiadas podría impedir la inhibición de la proliferación de células con fenotipo pro-inflamatorio en los meningiomas.

El silenciamiento del gen *PLAUR* (19q13) en células de meningioma inhibe el crecimiento e invasión tumoral (Kondraganti et al. 2006). Sin embargo, también se ha descrito una inmunoreactividad disminuida de *PLAUR* en zonas de atipia en meningiomas GII, así como en un grupo de astrocitomas/glioblastomas anaplásicos (Salajegheh, Rudnicki, and Smith 2005). La disminución de expresión de *PLAUR* en la serie que hemos estudiado —10.7 veces menos que en los controles de meninge— puede deberse al bajo grado de malignidad de los meningiomas estudiados, a que las muestras estudiadas son pequeñas biopsias que pueden no incluir la interfase entre el tumor y la meninge normal, donde su función degradadora de matriz extracelular

realmente favorece la invasión y, finalmente, a que este receptor multifuncional podría estar desempeñando actividades alternativas a la de invasión y metástasis para este tipo tumoral.

Por otro lado, se ha demostrado que el gen *SERPINE1* (7q21.3-q22) potencia o inhibe el crecimiento tumoral debido a una regulación de la angiogénesis dependiente de sus niveles de expresión (McMahon et al. 2001). Al igual que lo descrito para células de carcinoma de próstata (Soff et al. 1995), en la serie de meningiomas estudiada se encontró una reducida expresión de *SERPINE1*, 6.6 veces menos que los controles. Sin embargo, los complejos mecanismos de actuación de este gen sobre diversas vías (*PLAU-PLAUR* y vitronectina) no están claros en la actualidad, por lo que se desconoce el significado biológico de esta alteración en meningiomas y schwannomas.

La proteína codificada por el gen *IL8* (4q13-q21), es miembro de la familia de quemoquinas CXC, y es uno de los mayores mediadores de la respuesta inflamatoria. Evidencias recientes indican que un alto porcentaje de meningiomas expresan receptores de quemoquinas, cuyas vías de señalización son esenciales para la angiogénesis, migración y proliferación tumoral; sin embargo, se han encontrado patrones bajos de expresión de *IL8* por PCR a tiempo real en esas mismas muestras de meningioma (Barbieri et al. 2006; Salajegheh, Rudnicki, and Smith 2005). Estos datos concuerdan con lo encontrado en nuestro trabajo, en el que los meningiomas expresaron como media global 12.2 veces menos el gen *IL8* comparado con las muestras control.

FLT1 (13q12) es otro de los 7 genes que mostraron expresión diferencial entre meningiomas y controles de meninge. Este gen, uno de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGFR*), parece ser un regulador negativo de la proliferación de células endoteliales, al tener una gran afinidad por *VEGF* además de una pobre actividad tirosín kinasa (Hiratsuka et al.

1998). La baja expresión de *FLT1* en los meningiomas que hemos estudiado, 7.8 veces menos que en los controles, podría estar permitiendo la unión de *VEGF* a otros receptores con mayor actividad, favoreciendo así la proliferación vascular en los meningiomas.

Por otra parte, la proteína codificada por el gen oncosupresor *CDKN1A* (6p21.2) inhibe los complejos ciclina CDK2/CDK4 y por lo tanto regula la progresión del ciclo celular. En meningiomas se ha descrito una vía deficiente de señalización p53/CDKN1A en respuesta a daño al ADN, en la que se observó una disminución de expresión de *CDKN1A* en un amplio número de muestras de meningioma (Al Khalaf et al. 2007). Así mismo, los resultados obtenidos en nuestra serie mostraron una disminución de la expresión de este gen en los meningiomas con respecto a los controles (5.9 veces), lo que podría estar disminuyendo su capacidad oncosupresora.

La comparación de clases realizada sobre los datos obtenidos mediante microarrays de expresión provee un análisis comparativo de la expresión génica diferencial entre muestras de meninge normal y el grupo global de meningiomas estudiado. En su conjunto, los 7 genes anteriormente comentados representan un fenotipo específico de interacciones inhibitorias y de estimulación de diferentes vías celulares que establece las bases para realizar estudios en profundidad sobre los mecanismos aún desconocidos que subyacen en la tumorigénesis de los meningiomas.

Este conjunto global de diferencias se enmarca dentro de lo planteado en los objetivos iniciales del estudio, no obstante, igualmente llamativo fue el hallazgo por cluster jerarquizado de dos grupos moleculares de meningiomas claramente diferenciados entre sí (I3 y II5). Teniendo en cuenta esta información, se realizó un análisis de comparación de clases entre estos dos

subgrupos, incluyendo únicamente las 35 muestras de meningiomas que forman parte de ellos. Como resultado se obtuvo un conjunto de 38 genes diferencialmente expresados entre los dos grupos de meningiomas que establece una firma molecular para cada uno de ellos. Los 38 genes pertenecen a una gran variedad de vías funcionales y cabe destacar un subgrupo de estos genes, los primeros 13 que se muestran en la **Figura 4.5.1.**, por su alto grado de agrupamiento y significación estadística ($p < 0.0001$): *TIMP1*, *RAF1*, *ITGA1*, *FAS*, *ATM*, *CTNNB1*, *PIK3CB*, *MAPK14*, *PRKDC*, *RASA1*, *ITGB1*, *ITGAV* y *APAF1*, así como los genes *IFNA1* y *MMP9*, por su implicación en los grados tumorales.

Si bien es cierto que no podemos afirmar de forma estadísticamente significativa que estos grupos se relacionan con el grado tumoral, debido al reducido número de meningiomas de grado II del que disponemos, sí podemos decir que existe una clara tendencia al agrupamiento de las muestras de mayor grado en el grupo **II5**, cuyas expresiones globales se alejan más de aquellas que muestran los controles de meninge normal. Además, este grupo incluye a los genes *IFNA1* y *MMP9* que, como se muestra en la **tabla 4.5.**, se expresan diferencialmente entre las muestras de meningioma grados I y II, cuando se analizan en el conjunto global de meningiomas estudiados.

De estos dos últimos genes, *IFNA1* (9p22) induce apoptosis asociada a caspasas, PI3K y al gen proapoptótico *BAX* e induce la expresión de *PLAUR* (Thyrell et al. 2004; Wu, Murrell, and Wang 2002). Por lo tanto, su menor expresión en meningiomas GII (5.8 veces menos que en GI) favorece la inhibición de apoptosis en estos meningiomas atípicos y no favorece la expresión del gen *PLAUR* que, como se comentó anteriormente, es una de las constantes halladas en el conjunto de meningiomas comparado con los controles de meninge normal.

Por otro lado, *MMP9* (20q11.2-q13.1) participa en la degradación de la matriz extracelular y su sobre-expresión está asociada al potencial metastático e invasivo de meningiomas, al igual que los genes *PLAUR*, *PLAU* y *TIMP1* (Siddique et al. 2003); de estos dos últimos, *TIMP1*, que es un inhibidor de las MMP's, mostró una mayor expresión y *PLAU* una menor expresión en el grupo de meningiomas **II5** comparado con el grupo de meningiomas **I3**. La mayor expresión de *MMP9* tanto en los meningiomas GI (5.8 veces mayor), como en los meningiomas del grupo **I3**, comparados con los meningiomas GII y del grupo **II5**, respectivamente, podría estar evidenciando que la actividad degradadora de la matriz extracelular en los meningiomas benignos, además de favorecer la invasión, produce también alteración en las citoquinas, quemoquinas o factores de crecimiento que se encuentran en esta zona extracelular y que puede por lo tanto favorecer la progresión tumoral (Hrabec et al. 2007).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los niveles de expresión de los genes anteriormente comentados, estos dos grupos de meningiomas (**I3** y **II5**) podrían permitirnos establecer grados moleculares tumorales que, aunque no se correlacionen completamente con los grados histopatológicos clásicos, podrían estar diferenciando comportamientos tumorales de agresividad o establecer patrones pronósticos en cuanto a evolución clínica, recurrencia y/o tratamiento. Por ello, el siguiente paso deberá ser el estudio de correlaciones entre las variables clínicas de los pacientes con meningiomas y los dos grupos moleculares establecidos en este trabajo.

Otro dato sobre progresión y recurrencia se obtiene al comparar las muestras tumorales según sean meningiomas GI, meningiomas GII o recidivas de meningiomas GI. El análisis de comparación de clases mostró que el gen *S100A4* (1q21) —involucrado en la regulación de la progresión y diferenciación celular, con importantes funciones en la motilidad, invasión y

polimerización tubular (Tarabykina et al. 2007)—, se expresa en menor medida en los meningiomas GI y aumenta su expresión en GII. Este aumento de expresión fue aún mayor en los meningiomas recidivantes, lo que podría estar favoreciendo el fenotipo invasor en esta neoplasia. El aumento de expresión de este gen, que se localiza en el brazo largo del cromosoma 1, concuerda con las frecuentes ganancias de esta región (33%) en meningiomas atípicos y anaplásicos (Rey et al. 1988; Weber et al. 1997). Por lo tanto, consideramos que podría tratarse de un candidato importante en la progresión tumoral de meningiomas.

Otro de los objetivos de este trabajo es la comparación de los perfiles de expresión entre tumores de meninge y schwannomas. El análisis de comparación de clases mostró 16 genes con expresión significativamente menor y 3 genes con expresión significativamente mayor en las muestras de meningioma comparado con las muestras de schwannoma. Genes como *CDKN1A*, *FOS*, *IL8*, *PLAUR* y *SERPINE1* se expresan de 2 a 4 veces menos en meningiomas que en schwannomas. Una cifra reducida si la comparamos con las 6 a 25 veces menos que se expresan estos mismos genes en meningioma comparado con su meninge control. Los restantes 11 genes con menor expresión en meningiomas se encuentran en un rango de variación entre 2 y 5 veces con respecto a los schwannomas. Sin embargo, no mostraron variaciones significativas en el análisis entre meningiomas y control de meninge, por lo que podrían representar variaciones de expresión génica específicas de los schwannomas.

En nuestro estudio, los genes *EGFR*, *FGFR2* y *TIMP1* se expresaron respectivamente 4.1, 2.3 y 3.0 veces más en los meningiomas que en los schwannomas. Estos genes tampoco presentaron diferencias significativas entre los controles de meninge y el conjunto de meningiomas, aunque (*TIMP1* con $p < 0.0001$ y *EGFR* y *FGFR2* con $p < 0.005$) se expresaron más en el subgrupo II5 de meningiomas. La disminución de inmunoreactividad de *EGFR* (7p12) ha

sido asociada con mal pronóstico en meningiomas atípicos (Smith et al. 2007) y alteraciones de *EGFR* en tumores relacionados a NF2 han sido encontradas en líneas celulares de schwannoma de rata (Scoles et al. 2005), por lo que el conocimiento de sus niveles de expresión en estas neoplasias es importante para definir potenciales dianas terapéuticas. El gen *FGFR2* (10q26) es importante en procesos como la proliferación, migración y la diferenciación celular, por lo que este receptor tirosín kinasa es también una potencial diana terapéutica en muchos tipos tumorales, especialmente de origen neuronal, epitelial y esquelético (Eswarakumar, Lax, and Schlessinger 2005).

La falta de controles adecuados de células de schwann nos impide establecer diferencias de expresión génica entre las células normales y tumorales. Sin embargo, la comparación entre las dos neoplasias sí permite establecer patrones diferenciales de expresión entre dos tipos tumorales que comparten como característica principal la alteración en el gen *NF2* y que coexisten en la neurofibromatosis tipo II. Estos resultados muestran diferencias de expresión entre los dos tipos de neoplasia, que reflejan el comportamiento biológico de estos tumores y que por lo tanto podrían tener importancia diagnóstica y terapéutica.

Al igual que lo ocurrido con los meningiomas, los schwannomas mostraron en el análisis por cluster dos grupos claramente diferenciados (I2 y II4). El análisis de comparación de clases entre estos dos subgrupos de muestras halló 20 genes diferencialmente expresados, de los que la mitad forman parte de los genes diferenciales entre los dos grupos de meningiomas, mostrando además variaciones similares: *APAF1*, *ERBB2*, *FAS*, *ITGAV*, *ITGB1*, *ITGB3*, *KISS1*, *MAPK14*, *MMP9* y *RASA1*.

Estos resultados nos permiten establecer dos grupos moleculares de schwannomas a partir de un conjunto de genes relacionados con invasión y/o metástasis (*KISS1*, *MMP2* y *MMP9*), adhesión (*ITGA2*, *ITGA3*, *ITGA4*, *ITGAV*, *ITGB1* e *ITGB3*), transducción de señales y factores de transcripción (*RASA1*, *ERBB2*, *MAPK14*), apoptosis (*APAF1*, *FAS*, *CASP8* y *CFLAR*) y angiogénesis (*TEK*, *THBS2*, *TGFB1* y *FGF2*). El uso de estos marcadores moleculares podría mejorar los actuales métodos de clasificación y deberán ser estudiados en mayor profundidad para establecer posibles correlaciones de agresividad y pronóstico, así como una posible terapéutica molecular individualizada.

Como se ha comentado, la principal característica conocida en meningiomas y schwannomas es la alteración del gen *NF2* y/o la LOH de 22q. Por ello, se analizaron los patrones de expresión génica en las muestras tumorales de nuestra serie en búsqueda de posibles diferencias entre los tumores con estas alteraciones y los tumores sin ellas. El análisis de comparación de clases mostró 15 genes con expresión significativamente menor en las muestras con LOH para 22q y 11 genes con expresión significativamente menor en las muestras con alteración del gen *NF2* por MLPA. De los genes del grupo discriminado por los resultados obtenidos mediante la técnica de MLPA, únicamente el gen *ITGA3* no se encuentra a su vez en el grupo discriminado por los resultados obtenidos mediante la técnica de LOH. La disminución de expresión de estos genes podría ser consecuencia directa o indirecta de la ausencia o disminución de expresión del gen *NF2*, especialmente para los genes *CDKN1A*, *FLT1* y *PLAUR*, ya que se encontraron también diferencialmente expresados cuando se realizó la comparación de clases por presencia o ausencia de cualquier tipo de alteración en el gen *NF2*.

De los 5 genes presentes en el grupo discriminado por presencia o ausencia de LOH para 22q, pero que no están presentes en el grupo discriminado por presencia o ausencia de alteración

del gen *NF2* por MLPA, la disminución a la mitad de la expresión del gen *CHEK2*, también localizado en esta región, se puede explicar por la pérdida de uno de sus alelos (LOH). Los otros 4 genes (*ERBB2*, *ITGA2*, *ITGB3* y *MMP9*) podrían estar disminuyendo su expresión por la pérdida de uno o más genes reguladores localizados en 22q. Como se ha comentado anteriormente, las alteraciones del gen *NF2* no explican por sí solas todos los casos de meningiomas y schwannomas, por lo que se sugiere la participación de otro(s) GST, localizados en el cromosoma 22. De esta forma, el estudio de las vías celulares y de señalización de los genes *ERBB2*, *ITGA2*, *ITGB3* y *MMP9* podrían conducirnos a la identificación de GST candidatos en 22q.

Con los resultados obtenidos en la comparación de clases entre control de meninge y meningioma, se decidió buscar un predictor que nos permitiera clasificar futuras muestras tumorales como pertenecientes a una de las dos clases, ya que la clasificación de tumores basada en patrones de expresión génica podría ser también utilizada como marcador pronóstico con respecto a evolución, tiempo libre de enfermedad y supervivencia. Utilizando la expresión de 96 genes relacionados con cáncer y con un error optimizado para genes con expresión diferencial a nivel $p < 0.005$, se obtuvo un conjunto de 7 genes (*FOS*, *ICAM1*, *PLAUR*, *IL8*, *JUN*, *FLT1* y *SERPINE1*) que componen el clasificador.

Este clasificador, basado en un número reducido de genes y, por lo tanto, económica y logísticamente conveniente, podría permitir un diagnóstico certero en aquellos casos en los que la histopatología se encuentra en una zona gris. Además, teniendo en cuenta este clasificador se podrían estandarizar protocolos de resección tumoral que posteriormente permitieran establecer la presencia o ausencia de bordes libres de células tumorales, con las consecuentes repercusiones en evolución y vigilancia post-operatoria de los pacientes. La utilización de este predictor, una vez

fuera clínicamente validado, sumado al potencial clasificatorio de los distintos grupos moleculares establecidos por comparación de clases, supondrá un gran avance en el tratamiento de los meningiomas.

Los datos de expresión obtenidos en este trabajo pueden también ser utilizados en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, como ya se ha hecho con el gen *EGFR*. A partir de este receptor, sobre-expresado en un grupo de meningiomas (Andersson et al. 2004), se han desarrollado varios agentes terapéuticos como los inhibidores de tirosín kinasa gefitinib (ZD1839 [Iressa®]), erlotinib (OSI-774 [Tarceva®]) y lapatinib (GW-572016), y el anticuerpo monoclonal cetuximab (IMC-C225 [Erbix®]), así como el trastuzumab (Herceptin) para *ERBB2* (Hildebrandt et al. 2007; Nahta and Esteva 2007; O'Donovan and Crown 2007; Ono and Kuwano 2006; Wen and Drappatz 2006). Asimismo, como tumores altamente vascularizados, la inhibición de la angiogénesis juega un papel importante en el tratamiento de meningiomas. Inhibidores de *VEGF* —bevacizumab [Avastin®] y VEGF trap— o de su receptor (*VEGFR*) —vatalanib (PTK-787), sorafenib [Nexavar®] y sunitinib [Sutent®]— mejoran la supervivencia en cáncer colorectal, de ovario y de pulmón y pueden potencialmente inhibir la angiogénesis y disminuir el edema peritumoral en meningiomas (Burger 2007; Chow and Eckhardt 2007; Los, Roodhart, and Voest 2007; Strumberg et al. 2007; Wen and Drappatz 2006). Estos agentes, a pesar de estar siendo ampliamente estudiados en otros tipos tumorales como el cáncer de mama (Nahta and Esteva 2007; O'Donovan and Crown 2007), no han sido suficientemente evaluados en meningiomas y schwannomas.

Los patrones globales de expresión génica de los tumores son una representación de la biología molecular de éstos, y la diversidad de los patrones representa la diversidad biológica tumoral. Por lo tanto, relacionar los patrones de expresión génica con los tipos y subtipos tumorales y la evolución clínica nos ayudará a entender esta variabilidad. La capacidad de

clasificar los tumores en entidades separadas, identificando patrones de expresión génica recurrentes, permite establecer combinaciones de marcadores génicos que no pueden ser identificados por métodos clásicos. Este trabajo, además de identificar genes biológicamente relevantes en la génesis y progresión tumoral de meningiomas y schwannomas, ofrece la posibilidad de realizar subclasificaciones moleculares que deberán ser contrastadas con información clínica detallada para identificar posibles fenotipos clínicos, dentro de los que se puede incluir la capacidad invasora, el potencial metastático, la recurrencia o la resistencia y sensibilidad a terapias específicas.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 6.1. En los meningiomas y schwannomas estudiados se observó una alta frecuencia mutacional del gen *NF2*, un aumento significativo de LOH de 22q cuando aumenta la agresividad en muestras de meningioma y frecuentes pérdidas y ganancias en las muestras tumorales de grado I. Esto indica que estas últimas alteraciones no son exclusivas de las lesiones atípicas y anaplásicas. Se confirmó también la frecuencia de hipermetilación de promotores génicos como mecanismo epigenético de alteración de la expresión génica.
- 6.2. En las muestras de meningioma se observó una disminución en la expresión de 7 genes comparado con la meninge normal: *FOS*, *ICAM1*, *PLAUR*, *IL8*, *FLT1*, *SERPINE1* y *CDKN1A*. La expresión de estos genes representa un fenotipo específico de este tipo tumoral.
- 6.3. El análisis no supervisado identificó, a partir de los patrones de expresión génica, dos subgrupos moleculares para los meningiomas y dos subgrupos moleculares para los schwannomas.
- 6.4. Los dos subgrupos de meningiomas mostraron 38 genes diferencialmente expresados, que establecen dos grados moleculares tumorales con posibles implicaciones en cuanto a clasificación, agresividad y pronóstico.
- 6.5. Los dos subgrupos de schwannomas mostraron 20 genes diferencialmente expresados. También en este tipo tumoral se pueden establecer dos grupos moleculares con posibles implicaciones en cuanto a clasificación, agresividad y pronóstico.

- 6.6. Se establecieron patrones diferenciales de expresión entre schwannomas y meningiomas, ya que éstos últimos mostraron 16 genes con expresión significativamente menor: *ITGA6*, *THBS2*, *FOS*, *SERPINE1*, *IL8*, *NCAM1*, *ITGA2*, *PLAUR*, *CD44*, *ITGA3*, *CDKN2A*, *THBS1*, *PDGFB*, *PLAU*, *CDKN1A* y *COL18A1*, y 3 genes con expresión significativamente mayor: *EGFR*, *TIMP1* y *FGFR2*.
- 6.7. Las muestras con LOH para 22q y las muestras con alteración del gen *NF2* mostraron disminución de la expresión en un conjunto de genes, los cuales podrían dar lugar a la identificación de GST candidatos en 22q.
- 6.8. Se estableció un clasificador con 7 genes: *FOS*, *ICAM1*, *PLAUR*, *IL8*, *JUN*, *FLT1* y *SERPINE1*, que podrían predecir futuras muestras tumorales como meninge normal o como meningioma, teniendo así una posible utilidad como marcador clínico.

ANEXO I

7. ANEXO I

Tabla 3.2. Condiciones de PCR y SSCP para el análisis mutacional del gen NF2

Exón	bp	T°	Acr %	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
2	200	64	12% + 10% Gly	5'-TTGCTCACAGTGTCTTCCC-3'	5'-TCAGCCCCACCAGTTTCATC-3'
3	271	65	12% + 10% Gly	5'-GCTTCTTTGAGGGTAGCACA-3'	5'-GGTCAACTCTGAGGCCAACT-3'
4	187	64	12% + 10% Gly	5'-CCTCAGTTCCTCAGAG-3'	5'-CCCATGACCCAAATTAACGC-3'
5	173	57	12% + 10% Gly	5'-ATCTTTAGAATCTCAATCGC-3'	5'-AGCTTTCTTTTAGACCACAT-3'
6	181	49	10%	5'-AAACAATACCAAAATTTACTTCATG-3'	5'-GCCCATAAAGGAATGTAAACC-3'
7	170	57	12% + 10% Gly	5'-CCATCTCAGTTCAGTCCAATG-3'	5'-CTCACTCAGTCTCTGTCTAC-3'
8	248	65	10%	5'-GAAGGTTGAATAAAATTTGAGCCTC-3'	5'-GACAGGGAAAGATCTGCTGGACC-3'
9	122	48	12%	5'-GTTCTGCTTCATCTCC-3'	5'-GTAATGAAAACAGGATC-3'
10	166	48	10%	5'-CCTTTTGTCTGCTCTG-3'	5'-TCAGTTAAAACAAGGTG-3'
11	212	65	12% + 10% Gly	5'-TCGAGCCCTGTGATTCAATG-3'	5'-AAGTCCCCAAGTAGCCTCT-3'
12	284	65	10%	5'-CCCACCTCAGCTAAGAGCAC-3'	5'-CTCCTCGCAGTCTGGTG-3'
13	227	60	12% + 10% Gly	5'-GGTGTCTTTCTCTGCTACCT-3'	5'-GGGAGGAAAGAGAACATCAC-3'
14	197	64	10%	5'-CTGTGCTGTATGACCAAG-3'	5'-AGGGCACAGGGGGCTACA-3'
15	245	56	8%	5'-TCTCACTGTCTGCCAAG-3'	5'-GATCAGCAAAATACAAGAA-3'

T°: Temperatura de anillamiento. Acr %: Porcentaje de acrilamida. Gly: Glicerol

Tabla 3.3. Mix de sondas en SALSA MLPA P044 NF2

Longitud (nucleótidos)	SALSA MLPA	Posición Cromosómica
64-70-76-82	DQ-fragmentos control	
92	Sonda control sintética	2q14
130	Sonda Control 0797-L0463	5q31
139	NF2 Sonda M1563-L1134	región promotora
148	NF2, Sonda M1564-L4978	exón 1
157	Sonda Control 1063-L0061	14q13
166	NF2, Sonda M1565-L1137	exón 2
175	NF2, Sonda M1566-L1138	exón 3
184	Sonda Control 1217-L0694	4q35
193	NF2, Sonda M1567-L1139	exón 4
202	NF2, Sonda M1568-L1140	exón 5
211	Sonda Control 1344-L0555	9q21
220	NF2, Sonda M1569-L2031	exón 6
229	NF2, Sonda M1570-L1142	exón 7
238	Sonda Control 0517-L0097	2q14
247	NF2, Sonda M1571-L1143	exón 8
256	NF2, Sonda M1572-L1144	exón 9
265	Sonda Control 3075-L2475	6q26
274	NF2, Sonda M2485-L1984	exón 10
283	NF2, Sonda M1574-L4981	exón 11
292	Sonda Control 0990-L0567	11p12
301	NF2 Sonda M1575-L1147	exón 12
310	NF2, Sonda M1576-L1148	exón 13
319	Sonda Control 1042-L0791	8q24
328	NF2, Sonda M1577-L1149	exón 14
337	NF2, Sonda M1578-L1150	exón 15
346	Sonda Control 0987-L0330	2p11
355	NF2, Sonda M3318-L2736	exón 16
364	NF2, Sonda M1580-L1152	exón 17
373	Sonda Control, 1235-L0773	22q11
382	NF2, Sonda M1581-L1135	región promotora
391	NIPSNAP1, Sonda M2580-L2042	a 22 Kb de NF2
400	Sonda Control 0977-L0564	15q24
409	CABP7 probe 3317-L2735	a 26 Kb de NF2
418	Sonda Control 2670-L2137	11q23

Tabla 3.4. Mix de sondas en SALSA MS-MLPA ME001 TUMOR SUPRESOR MIX

Longitud (nucleótidos)	SALSA MLPA	Sitio HhaI	Gen	Posición Cromosómica
64-70-76-82	DQ-fragmentos control			
88-92-96	DD-fragmentos control			
136	Sonda 0981-L0566		CREM	10p12.1
142	Sonda 2255-L3752	+	TIMP3	22q12.3
148	Sonda 2065-L1586	+	APC	5q21
154	Sonda 3366-L2750		PARK2	6q25.2-q27
160	Sonda 1524-L1744	+	CDKN2A	9p21
166	Sonda 1686-L1266	+	MLH1	3p21.3
175	Sonda 0554-L0123		TNFRSF1A	12p13
184	Sonda 4044-L3849	+	ATM	11q22.3
193	Sonda 4040-L1698	+	RARB	3p24
202	Sonda 1245-L0793		MLH3	14q24.3
211	Sonda 0607-L0591	+	CDKN2B	9p21
220	Sonda 3804-L0949	+	HIC1	17p13.3
229	Sonda 2334-L1820		PAH	12q23
238	Sonda 3813-L3753	+	CHFR	12q24.33
247	Sonda 5162-L4543	+	BRCA1	17q21
256	Sonda 0587-L0382		BCL2	18q21.3
265	Sonda 2761-L2210	+	CASP8	2q33-q34
274	Sonda 7949-L7730	+	CDKN1B	12p13.1
283	Sonda 1832-L1397		TSC2	16p13.3
292	Sonda 2203-L8261	+	PTEN	10q23.31
301	Sonda 4042-L3755	+	BRCA2	13q12
310	Sonda 3184-L2523		CDK6	7q21.3
319	Sonda 3817-L1731	+	CD44	11p13
328	Sonda 2248-L1734	+	RASSF1	3p21.3
337	Sonda 2416-L1862		CDH1	16q22.1
346	Sonda 1677-L1257	+	DAPK1	9q34.1
355	Sonda 3810-L1211	+	VHL	3p26-p25
364	Sonda 1234-L0781		AI651963	10p14
373	Sonda 2202-L1700	+	ESR1	6q25.1
382	Sonda 3807-L2159	+	RASSF1	3p21.3
391	Sonda 0713-L0108		KLK3	19q13
400	Sonda 4050-L1263	+	TP73	1p36
409	Sonda 2201-L1699	+	FHIT	3p14.2
418	Sonda 1617-L1199		BRCA2	13q12.3
427	Sonda 3819-L3848	+	IGSF4	11q23
436	Sonda 7946-L7727	+	CDH13	16q24.2
445	Sonda 0678-L0124		TNFRSF7	12p13
454	Sonda 1638-L1176	+	GSTP1	11q13
463	Sonda 2260-L1747	+	MLH1	03p21.3
472	Sonda 3984-L3251		CTNNB1	03p22
481	Sonda 2683-L2148		CASR	3q13.3-q21

Tabla 3.5. GENES INCLUIDOS EN LA MEMBRANA DE MICROARRAY

#	Símbolo	Descripción	Locus	Resumen
1	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	14q32.32	Codifica para una proteína quinasa de serina/treonina. AKT1 y su afin AKT2, son activados por PDGF. En el sistema nervioso en desarrollo es un mediador crítico de la supervivencia neuronal inducida por factor de crecimiento, suprimiendo la apoptosis por inactivación de componentes de la maquinaria apoptótica.
2	ANGPT1	Angiopoietin 1	8q22.3-q23	Activa el receptor tirosina quinasa específico de células endoteliales al inducir la fosforilación de su tirosina. Es mediador de interacciones recíprocas entre el endotelio y la matriz que le rodea. También contribuye a la maduración y estabilidad de vasos sanguíneos y puede estar involucrado en el desarrollo temprano del corazón.
3	ANGPT2	Angiopoietin 2	8p23.1	Antagonista natural tanto para ANGPT1 como para TIE2; se expresa únicamente en los sitios de remodelamiento vascular; similar a la angiopoietina-1.
4	APAF1	Apoptotic protease activating factor	12q23	Codifica para una proteína citoplasmática que inicia la apoptosis. Después de unirse al citocromo c y a dATP, forma un apoptosoma oligomérico que se une y corta la preproteína caspasa 9, liberando su forma madura y activa, estimulando la subsecuente cascada proapoptótica de caspasa.
5	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	11q22-q23	Pertenece a la familia PI3/PI4 quinasa. Actúa como punto de control en el ciclo celular, regulando proteínas como p53, BRCA1, CHK2, RAD17, RAD9 y NBS1. Podría ser un controlador maestro de los puntos de control en el ciclo celular, requeridos para la respuesta celular al daño del ADN y para la estabilidad genómica.
6	BAD	BCL2-antagonist of cell death	11q13.1	Miembro de la familia BCL-2 de reguladores de la muerte celular programada. Regula positivamente la apoptosis celular formando heterodímeros con BCL-xL y BCL-2, revirtiendo así su actividad represora de muerte celular. Las proteínas quinasa AKT y MAP regulan esta proteína.
7	BAX	BCL2-associated X protein	19q13.3-q13.4	Miembro de la familia BCL-2 de reguladores de la muerte celular programada. Forma un heterodímero con BCL2 y funciona como activador de la apoptosis. Induce pérdida del potencial de membrana y liberación de citocromo c. Este gen está regulado por P53.
8	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	18q21.33; 18q21.3	Codifica para una proteína integral de la membrana mitocondrial externa que inhibe la muerte apoptótica de algunas células como los linfocitos. La expresión constitutiva de BCL2 podría ser la causa del linfoma folicular.
9	BCL2L1	BCL2-like 1	20q11.21	Miembro de la familia BCL-2. Sus proteínas localizan en la membrana mitocondrial externa y regulan la apertura del canal de membrana mitocondrial dependiente de voltaje (VDAC), controlando la producción de especies reactivas a oxígeno y liberando citocromo c, lo que lo hace un potente inductor de la apoptosis celular.
10	BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	17q25	Miembro de la familia de inhibidores de apoptosis (IAP), reguladoras negativas que previenen la muerte celular apoptótica. Su expresión es alta durante el desarrollo fetal, aunque baja en tejidos adultos. El transcrito antisentido participa en la regulación de la expresión de este gen.
11	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	17q21	Codifica para una fosfoproteína nuclear de mantenimiento de la estabilidad genómica y actúa como supresor de tumor. Se combina con otros supresores de tumor, sensores de daño de ADN y transductores de señales para formar complejos proteicos conocidos como BASC. Tiene funciones en la transcripción, reparación de la ruptura de dobles cadenas en el ADN y en la recombinación.
12	BRCA2	Breast cancer 2, early onset	13q12.3	BRCA2 funciona como un gen supresor de tumor. La similitud y el análisis funcional de las proteínas de BRCA2 y BRCA1 sugieren que actúan en la misma vía genética. BRCA1 y BRCA2 tienen potencial de activación transcripcional y están asociadas con la activación de reparación de cortes de doble cadena y/o recombinación homóloga.
13	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	2q33-q34	Miembro de la familia proteasas de cisteína/ácido aspártico (caspase), esenciales en la fase de ejecución de la apoptosis celular. Su proteína actúa en la muerte celular programada mediada por Fas y varios estímulos apoptóticos. Está implicado en las enfermedades neurodegenerativas.
14	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease	1p36.3-p36.1	Miembro de la familia proteasa de cisteína/ácido aspártico (caspase), su proteína es procesada por la caspasa APAF1; se piensa que este paso es uno de los más tempranos en la cascada de activación de caspasa.
15	CCND1	Cyclin D1	11q13	Esta ciclina forma un complejo y funciona como subunidad reguladora de CDK4 o CDK6, cuyas actividades son requeridas para la transición G1/S del ciclo celular. Interactúa con el supresor de tumor Rb, que además regula positivamente su expresión génica. Es frecuente encontrar mutaciones, amplificación y sobreexpresión de este gen, lo que podría contribuir a la tumorigénesis.

16	CCNE1	Cyclin E1	19q12	Esta ciclina forma un complejo y funciona como subunidad reguladora de CDK2, cuya actividad es requerida para la transición G1/S del ciclo celular. La sobreexpresión de este gen produce inestabilidad cromosómica y por lo tanto puede contribuir a la tumorigénesis. Juega un papel crítico en la promoción de la progresión del ciclo celular en la ausencia de pRB.
17	CD44	CD44 antigen	11p13	Codificada para una glicoproteína de superficie celular involucrada en interacciones célula-célula, adhesión celular y migración. Es un receptor para ácido hialurónico (HA) y también puede interactuar con otros ligandos como osteopontina, colágenos y metaloproteinasas de matriz (MMPs). Participa en activación linfocitaria, recirculación y anclaje, hematopoiesis y metástasis tumoral.
18	CDC25A	Cell division cycle 25A	3p21	Miembro de la familia de fosfatasa CDC25. Su presencia se requiere para la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular. Activa a la quinasa dependiente de ciclina CDC2. Es específicamente degradada en respuesta a daño del ADN. Es un oncogen, sin embargo, su papel exacto en la oncogénesis no se ha demostrado.
19	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	16q22.1	Esta caderina produce una glicoproteína de adhesión célula-célula calcio dependiente. Se piensa que su pérdida de función contribuye a la progresión tumoral por incremento de proliferación, invasión y/o metástasis.
20	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	12q14	Codifica para una quinasa de serina/treonina importante para la progresión de la fase G1 del ciclo celular, que es controlado por las subunidades reguladoras tipo D de ciclinas y por el DDK-inhibidor p16 ^(INK4a) . Esta quinasa es responsable de la fosforilación del producto del gen del retinoblastoma (Rb).
21	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	6p21.2	Este inhibidor de quinasa dependiente de ciclina se une a, e inhibe, la actividad de los complejos de ciclina CDK2 o CDK4, y por tanto funciona como regulador de la progresión del ciclo celular en fase G1. Su expresión está controlada por p53. Puede interactuar con antígenos de proliferación celular nuclear (PCNA) y participa como regulador en la fase S de replicación y reparación de daño del ADN.
22	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	12p13.1-p12	Este inhibidor de quinasa dependiente de ciclina previene la activación de los complejos de ciclina E-CDK2 o D-CDK4, y funciona como regulador del ciclo celular en fase G1. La degradación de la proteína es requerida para la transición celular de estado quiescente a proliferativo.
23	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)	9p21	Este gen actúa como inhibidor de CDK4 quinasa o como estabilizador de p53, secuestrando a MDM1. Este gen está frecuentemente mutado o delecionado en una gran variedad de tumores y se sabe que cumple un papel importante como gen supresor de tumor.
24	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	2q33-q34	El inhibidor de la activación inducida de muerte celular mejor conocido es la proteína inhibitoria CFLAR. Es estructuralmente similar a la caspasa 8. Debido a esta homología estructural, interfiere con la activación de caspasa 8 al competir por la unión al complejo receptor de muerte celular.
25	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1	21q22.3	Codifica para la cadena alpha del colágeno tipo XVIII. El fragmento C-terminal producido proteolíticamente a partir del colágeno tipo XVIII es la endostatina, una potente proteína antiangiogénica.
26	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1	3p21	Produce una proteína de uniones adherentes (AJs), crítica para el establecimiento y mantenimiento de las capas epiteliales. Las AJs median la adhesión entre células y anclan el citoesqueleto, por lo tanto, regulan el crecimiento y comportamiento celular normal. También pueden funcionar en la transmisión de señales de inhibición por contacto.
27	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)	4q25	Interviene en diferenciación y es un potente factor mitogénico para células en cultivo de origen ectodérmico y mesodérmico. Su precursor podría existir como una molécula de unión a membrana que es proteolíticamente cortada para generar la hormona que estimula la división celular.
28	EGFR	Epidermal growth factor receptor	7p12	Pertenece a la familia de receptores ErbB, implicados en proliferación y diferenciación celular. El gen presenta una amplificación en forma de "double-minutes", acompañada de reordenamientos génicos y mutaciones.
29	ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	17q11.2-q12; 17q21.1	Codifica para un receptor tirosina quinasa que estabiliza la unión de ligandos EGF, favoreciendo la activación de vías de señalización mediadas por quinasas como las mitogénicas o la de fosfatidilinositol 3-quinasa. Su amplificación y/o sobreexpresión ha sido descrita en varios tumores.
30	ETS2	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	21q22.3; 21q22.2	Codifica para un miembro de las proteínas endoteliales Ets. Transactiva el promotor de CD13/APN. Su fosforilación mediada por RAS/MAPK es un requisito para la inducción endotelial de CD13/APN. Ets-2 y sus dianas juegan un papel esencial en la función celular endotelial.
31	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	4q26-q27	Miembro de la familia de factores de crecimiento fibroblástico (FGF), ha sido implicado en el desarrollo límbico y de SNC, así como en crecimiento tumoral. Los miembros de esta familia se unen a heparina y tienen amplia actividad mitogénica y angiogénica.

32	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2	10q26	Miembro de la altamente conservada familia de factores de crecimiento fibroblástico (FGF). Interacciona con factores de crecimiento epidérmico que influyen en la mitogénesis y diferenciación. Mutaciones en este gen se relacionan con craneosinostosis y otras malformaciones óseas.
33	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1	13q12	Oncogén perteneciente a la familia de genes src y está relacionado con el oncogén ROS. Muestra actividad tirosina quinasa, importante para el control de la proliferación y diferenciación celular.
34	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	14q24.3	La familia de genes FOS tiene 4 miembros: FOS, FOSB, FOSL1, and FOSL2. Están implicados como reguladores de la proliferación diferenciación y transformación celular. En algunos casos, la expresión del gen FOS ha sido asociada también a muerte celular apoptótica.
35	HGF	Hepatocyte growth factor	7q21.1	Regula el crecimiento y motilidad celular y la morfogénesis por activación de una cascada tirosina quinasa después de la unión al receptor proto-oncogénico c-Met. La proteína actúa como una citoquina multifuncional predominantemente en células de origen epitelial. Tiene un papel central en angiogénesis, tumorigénesis y regeneración tisular.
36	ICAM1	Intercellular adhesion molecule1	19p13.3-p13.2	ICAM1 (CD54) se expresa típicamente en células endoteliales y del sistema inmune. Su proteína se une a las integrinas CD11a / CD18 o CD11b / CD18. ICAM1 es también utilizada por los Rhinovirus como receptor.
37	IFNA1	Interferon, alpha 1	9p22	El interferón leucocitario es producido predominantemente por los linfocitos B. El interferón inmune es producido por linfocito T estimulados antigénica o mitogénicamente. La transcripción del gen p53 es inducida por IFNA/IFNB, acompañado por un incremento de los niveles de proteína p53. La señalización IFNA/B por sí sola no activa p53, pero contribuye en su respuesta a señales de estrés.
38	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	9p21	La proteína codificada está implicada críticamente en la defensa antiviral mediada por p53 y tiene funciones en la angiogénesis.
39	IGF1	Insulin-like growth factor 1	12q22-q23	Las somatomedinas, o factores de crecimiento similares a insulina (IGFs), son importantes en el crecimiento y desarrollo de mamíferos. IGF1 media en la promoción de crecimiento de la GH. Se han caracterizado 3 somatomedinas principales: somatomedina C (IGF1), somatomedina A, y somatomedina B.
40	IL8	Interleukin 8	4q13-q21	Miembro de la familia de las quimioquinas CXC, es uno de los mayores mediadores de la respuesta inflamatoria. Funciona como quimioattractor y también es un potente factor angiogénico. Junto con otros 10 miembros de la familia forma un "cluster" en la región cromosómica 4q.
41	ITGA1	Integrin, alpha 1	5q11.2	Codifica para la subunidad alpha 1 de las integrinas. Las integrinas son proteínas heterodiméricas integrales de membrana compuestas de una cadena alpha y una beta. ITGA1 heterodimeriza con la subunidad beta 1 para formar un receptor para colágeno y laminina. Igual que las demás integrinas, está involucrada en adhesión célula-célula y puede estar implicada en inflamación, fibrosis, embriogénesis, hemostasis, reparación tisular, respuesta inmune y difusión metastásica.
42	ITGA2	Integrin, alpha 2	5q23-q31	Codifica para la cadena alpha 2 de las integrinas.
43	ITGA3	Integrin, alpha 3	17q21.33	Codifica para la cadena alpha 3 de las integrinas, que se une a la integrina beta 1.
44	ITGA4	Integrin, alpha 4	2q31.3	Codifica para la cadena alpha 4 de las integrinas. Puede asociarse con la cadena beta 1 o la beta 7.
45	ITGA5	Integrin, alpha 5	12q11-q13	Codifica para la cadena alpha 5 de las integrinas, que se une al receptor beta 1 de la fibrinectina.
46	ITGA6	Integrin, alpha 6	2q31.1	Codifica para la cadena alpha 6 de las integrinas, que se puede unir a varias cadenas de la familia.
47	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor)	2q31-q32	Codifica para la cadena alpha V de las integrinas. Se puede asociar a múltiples cadenas beta. La más conocida es su asociación con la beta 3, a lo que se conoce como receptor Vitronectina (VNR).
48	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor)	10p11.2	Codifica para la cadena beta 1 de las integrinas.
49	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa)	17q21.32	Codifica para la cadena beta 3 de las integrinas, que se asocia a la cadena alpha 11b en plaquetas.
50	ITGB5	Integrin, beta 5	3q21.2	Codifica para la cadena beta 5 de las integrinas.
51	JUN	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	1p32-p31	Es el gen homólogo de transformación del sarcoma virus aviar 17. El gen se localiza en 1p32-p31, región envuelta tanto en traslocaciones como deleciones de neoplasias en humanos.
52	CD82	Suppression of tumorigenicity 6, prostate	11p11.2	Codifica para una proteína supresora de metástasis. Está hiporegulada en progresión tumoral y puede ser activada por p53 con una fuerte correlación de expresión. La baja presencia de las dos proteínas confiere una pobre supervivencia en el cáncer de próstata.
53	KISS1	KiSS-1 metastasis-suppressor	1q32	Gen supresor de metástasis en melanomas y Ca de mama sin efectos sobre la tumorigenicidad. Podría actuar como inhibidor de quimiotaxis e invasión por medio de cambios en la reorganización del citoesqueleto y de las vías de adhesión celular.

54	MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	15q22.1-q22.33	Miembro de la familia de proteínas quinasa mitógeno activadas (MAP), actúa como punto de integración de múltiples señales bioquímicas. Está involucrada en proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y desarrollo.
55	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	6p21.3-p21.2	Miembro de la familia MAP quinasa, es activada por enzimas proinflamatorias para interactuar con ATF2, MEF2C, MAX, CDC25B y p53, lo que le confiere funciones en transcripción por estrés y regulación del ciclo celular, así como en respuesta genotóxica al estrés.
56	MDM2	Transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein	12q14.3-q15	Es un gen diana de p53. Su fosfoproteína se une e inhibe la transactivación por p53, como parte de un ciclo autoregulatorio de retroalimentación negativa. Afecta al ciclo celular, apoptosis y tumorigénesis por su interacción con otras proteínas como RB1 y RPL5.
57	MMP1	Matrix metalloproteinase 1	11q22.3	La familia de metaloproteinasas de la matriz (MMP) actúa en la ruptura de la matriz extracelular en procesos fisiológicos como el desarrollo embriológico y reproducción o en patológicos como la metástasis. Este gen codifica para una enzima que rompe el colágeno intersticial tipos I, II y III.
58	MMP2	Matrix metalloproteinase 2	16q13-q21	Este gen codifica para una enzima que rompe el colágeno tipo IV, el mayor componente estructural de las membranas basales. Su proteína es importante en la menstruación, regulación de vascularización y respuesta inflamatoria.
59	MMP9	Matrix metalloproteinase 9	20q11.2-q13.1	Codifica para una enzima que rompe el colágeno tipos IV y V. Podría estar implicado en la movilización de progenitores hematopoyéticos de la médula ósea y en remodelamiento tisular asociado a tumor.
60	MTA1	Metastasis associated 1	14q32.3	Relacionado con el potencial metastásico de al menos dos tipos de carcinoma, a pesar de estar expresado en muchos tejidos normales. El perfil y actividad de este gen sugieren su compromiso en regulación de transcripción a través de remodelamiento cromatínico.
61	MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A	6p21.3	Codifica para la altamente polimórfica secuencia A relacionada a la cadena MHC (HLA) clase I. Se piensa que funciona como antígeno inducido por estrés ampliamente reconocido por las células T gamma-delta del epitelio intestinal.
62	MYC	Myelocytomatosis viral oncogene homolog	8q24.12-q24.13	Codifica para una fosfoproteína nuclear involucrada en progresión, apoptosis y transformación celular. Funciona como factor de transcripción que regula genes diana específicos.
63	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	11q23.1	Pertenece a la familia de sialoglicoproteínas de superficie celular de la superfamilia de inmunoglobulinas. Tiene gran importancia en los mecanismos de adhesión celular. Se expresa en la superficie celular de la mayoría de carcinomas de células pequeñas de pulmón.
64	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	4q24	Es un regulador de la transcripción activado por estímulos intra y extracelulares como las citoquinas, radicales libres, radiación ultravioleta o productos bacterianos y virales. Su activación inapropiada se asocia con enfermedades inflamatorias y su inhibición persistente lleva a un deficiente desarrollo celular inmune o crecimiento celular retrasado.
65	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	14q13	Esta proteína I-kappa-B inhibe el complejo NFkB, desregulando la transcripción de sus genes diana y afectando procesos como la inflamación, respuesta inmune y crecimiento celular.
66	NME4	Non-metastatic cells 4, protein expressed in	16p13.3	Pertenece a la familia de genes nm23. La enzima para la que codifica se encuentra altamente expresada en tumores si se compara con tejidos normales y se le ha relacionado con invasión y metástasis.
67	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	7p22	La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas, que actúan como factores mitogénicos para las células de origen mesenquimal.
68	PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide	22q12.3-q13.1	La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas. Las mutaciones en este gen se asocian a meningiomas.
69	PIK3CB	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	3q22.3	Las PIK han sido implicadas en las vías de señalización que regulan el crecimiento celular debido a su activación en respuesta a varios estímulos mitogénicos.
70	PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1	5q13.1	Codifica para una subunidad reguladora de la PI3K, que juega un papel importante en las acciones metabólicas de la insulina y una mutación en este gen ha sido asociada a resistencia a insulina. La PI3K regula la progresión y proliferación celular.
71	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	10q24	Este gen codifica para una proteasa de serina que convierte el plasminógeno en plasmina y por lo tanto, está envuelto en degradación de la matriz extracelular y posiblemente en proliferación y migración celular tumoral.
72	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	19q13	Codifica para un activador uroquinasa de plasminógeno que interviene en procesos normales y patológicos relacionados con la activación en superficie celular del plasminógeno y la degradación localizada de la matriz extracelular.

73	PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	8q11	Codifica para la subunidad catalítica de una quinasa de serina/treonina dependiente de ADN (DNA-PK). Participa en el control del ciclo celular y reparación al daño del ADN.
74	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	22q11; 22q12.1	Codifica para un supresor de tumor y regulador de punto de control del ciclo celular. Estabiliza a p53 e interactúa con BRCA1 para recuperar la supervivencia celular después del daño al ADN.
75	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	3p25	Codifica para una MAP-quinasa que activa una vía de efectores pleiotrópicos de la fisiología celular y ayuda en el control de la expresión génica que afecta a la división del ciclo celular, apoptosis, diferenciación y migración celular.
76	RASA1	RAS p21 protein activator 1	5q13.3	La proteína codificada actúa como supresor de la actividad RAS permitiendo el control de la proliferación y diferenciación celular.
77	RB1	Retinoblastoma 1	13q14.2	Codifica para un gen supresor de tumor que actúa como regulador de la progresión del ciclo celular, diferenciación y apoptosis. Su inactivación se asocia a neoplasia, especialmente de retina.
78	S100A4	S100 calcium binding protein A4	1q21	Se asocia a regulación de progresión del ciclo celular y diferenciación. Su proteína puede funcionar en motilidad, invasión y polimerización de tubulina. Rearreglos cromosómicos y expresión génica alterada para este gen se asocian con metástasis.
79	SERPINB2	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2	18q21.3	La proteína codificada por este gen es un inhibidor de proteasa plasmático y miembro de la clase de inhibidores de proteasa de serina. Está altamente relacionado con los procesos de invasión y metástasis.
80	SERPINB5	SERPIN clade B, member 5	18q21.3	La proteína codificada por este gen es un inhibidor de proteasa plasmático y miembro de la clase de inhibidores de proteasa de serina. Está altamente relacionado con los procesos de invasión y metástasis.
81	SERPINE1	SERPIN, clade E, member 1	7q21.3-q22	La proteína codificada por este gen es un inhibidor de proteasa plasmático y miembro de la clase de inhibidores de proteasa de serina. Está altamente relacionado con los procesos de invasión y metástasis.
82	SRC	V-src sarcoma viral oncogene homolog (avian)	20q12-q13	Proto-oncogén envuelto en la regulación del desarrollo embrológico y crecimiento celular. Codifica para una proteína tirosina quinasa.
83	TEK	Tyrosine kinase, endothelial	9p21	Codifica para un receptor tirosina quinasa. Su vía de señalización parece ser crítica para la comunicación de las células musculares lisas endoteliales en la morfogénesis venosa.
84	TERT	Telomerase reverse transcriptase	5p15.33	Codifica para el componente con actividad transcriptasa inversa de la telomerasa, que está involucrada en senescencia celular.
85	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	19q13.2; 19q13.1	Codifica para un péptido multifuncional que controla la proliferación, diferenciación y otras funciones celulares. La disregulación de su activación y señalización puede resultar en apoptosis.
86	TGFBR1	TGF, beta receptor I	9q22	Codifica para una proteína quinasa de serina/treonina que forma complejos heterodiméricos con los receptores TGF-beta tipo II. Está involucrado en angiogénesis.
87	THBS1	Thrombospondin 1	15q15	Codifica para una glicoproteína de adhesión que media las interacciones célula-célula y célula-matriz. Es importante en la agregación plaquetaria, angiogénesis y tumorigénesis.
88	THBS2	Thrombospondin 2	6q27	Codifica para una glicoproteína de adhesión que media las interacciones célula-célula y célula-matriz. Es un potente inhibidor del crecimiento tumoral y la angiogénesis. Podría estar involucrado en adhesión y migración celular.
89	TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Xp11.3-p11.23	Pertenece a una familia de inhibidores de metaloproteinasas de matriz. Es capaz de favorecer la proliferación celular y tiene una función anti-apoptótica. Su inactivación en el cromosoma X en las mujeres es pleomórfica.
90	TNF	Tumor necrosis factor	6p21.3	Codifica para una citoquina proinflamatoria multifuncional. Actúa en proliferación y diferenciación celular, apoptosis, metabolismo lipídico y coagulación. Se relaciona con enfermedades autoinmunes, resistencia a insulina y cáncer.
91	TNFRSF10B	TNF receptor superfamily, member 10b	8p22-p21	Pertenece a la superfamilia de receptores TNF. Este receptor puede ser activado por ligandos TNF inductores de apoptosis y transducir la señal de apoptosis.
92	TNFRSF25	TNF receptor superfamily, member 25	1p36.2	Pertenece a la superfamilia de receptores TNF. Interviene en la regulación de homeostasis linfocitaria y regula la apoptosis.
93	TNFRSF1A	TNF receptor superfamily, member 1A	12p13.2	Pertenece a la superfamilia de receptores TNF. Su proteína es uno de los mayores receptores para el TNF alpha. Media la apoptosis y regula la inflamación.
94	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	10q24.1	Pertenece a la superfamilia de receptores TNF. Actúa en la regulación fisiológica de la muerte celular programada, está implicado en la patogénesis de varias neoplasias y enfermedades del sistema inmune.

95	TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	17p13.1	Codifica para una proteína nuclear que regula el ciclo celular en la transición G0/G1. Se encuentra a bajos niveles en las células normales y en las neoplásicas a altos niveles de expresión. Funciona como gen supresor de tumor.
96	VEGFA	Vascular endothelial growth factor	6p12	Codifica para un mitógeno glicosilado que actúa específicamente en células endoteliales mediando la permeabilidad vascular incrementada, induciendo angiogénesis, vasculogénesis y crecimiento celular endotelial, promoviendo la migración celular e inhibiendo la apoptosis.
97	PUC18	PUC18 Plasmid DNA		Vector de clonación circular sintético.
98				
99				
100				Control negativo
101				Control negativo
102				Control negativo
103	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	12p13	Su producto cataliza un paso importante en el metabolismo energético de carbohidratos. Existe como un tetrámero de cadenas idénticas.
104				
105	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	7p13-p11.2	Miembro de la familia peptidil-prolil cis/trans isomerasa (PPIase). Codifica para una proteína de unión a ciclosporina, con la que regula la inmunosupresión.
106				
107				
108				
109	RPL13A	Ribosomal protein L13a	19q13.3	Este gen codifica para una proteína ribosomal que es un componente de la subunidad 60S de los ribosomas. Es co-transcrito con genes de ARN nucleolar pequeño localizados en sus intrones. Igual que en otros genes codificantes de riboproteínas, hay múltiples pseudogenes procesados de este gen dispersos a lo largo del genoma.
110				
111	ACTB	Actin, beta	7p15-p12	La beta actina es una de las 6 diferentes isoformas de la actina que han sido identificadas y es una de las dos actinas de citoesqueleto no muscular. Las actinas son proteínas altamente conservadas que están involucradas en motilidad, estructura e integridad celular.
112				

8. REFERENCIAS

1. Al Khalaf HH et al (2007) The p53/p21 DNA damage-signaling pathway is defective in most meningioma cells. *J.Neurooncol.* 83 (1):9-15.
2. Amatya VJ, Takeshima Y, and Inai K (2004) Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Mod.Pathol.* 17 (6):705-710.
3. Anderson TD et al (2000) Prevalence of unsuspected acoustic neuroma found by magnetic resonance imaging. *Otolaryngol.Head Neck Surg.* 122 (5):643-646.
4. Andersson U et al (2004) Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol.(Berl)* 108 (2):135-142.
5. Antinheimo J et al (2000) Genetic aberrations in sporadic and neurofibromatosis 2 (NF2)-associated schwannomas studied by comparative genomic hybridization (CGH). *Acta Neurochir.(Wien.)* 142 (10):1099-1104.
6. Arai E et al (1992) Constitutional translocation t(4;22) (q12;q12.2) associated with neurofibromatosis type 2. *Am.J.Med.Genet.* 44 (2):163-167.
7. Arena S et al (2004) Expression of somatostatin receptor mRNA in human meningiomas and their implication in in vitro antiproliferative activity. *J.Neurooncol.* 66 (1-2):155-166.
8. Baia GS et al (2006) A genetic strategy to overcome the senescence of primary meningioma cell cultures. *J.Neurooncol.* 78 (2):113-121.
9. Ball CA et al (2004) Submission of microarray data to public repositories. *PLoS.Biol.* 2 (9):E317.
10. Barbieri F et al (2006) CXC receptor and chemokine expression in human meningioma: SDF1/CXCR4 signaling activates ERK1/2 and stimulates meningioma cell proliferation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1090:332-343.
11. Baser ME, DG RE, and Gutmann DH (2003) Neurofibromatosis 2. *Curr.Opin.Neurol.* 16 (1):27-33.
12. Baser ME et al (2004) Genotype-phenotype correlations for nervous system tumors in neurofibromatosis 2: a population-based study. *Am.J.Hum.Genet.* 75 (2):231-239.
13. Baser ME, Makariou EV, and Parry DM (2002) Predictors of vestibular schwannoma growth in patients with neurofibromatosis Type 2. *J.Neurosurg.* 96 (2):217-222.
14. Bello MJ et al (2004) DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in meningiomas: relationship with the allelic status at 1p and 22q. *Acta Neuropathol.(Berl)* 108 (5):413-421.
15. Bello MJ et al (1994) Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes.Cancer* 9 (4):296-298.
16. Bello MJ et al (2007) DNA methylation pattern in 16 tumor-related genes in schwannomas. *Cancer Genet.Cytogenet.* 172 (1):84-86.
17. Benson M and Breitling R (2006) Network theory to understand microarray studies of complex diseases. *Curr.Mol.Med.* 6 (6):695-701.

18. Boikos SA and Stratakis CA (2006) Carney complex: pathology and molecular genetics. *Neuroendocrinology* 83 (3-4):189-199.
19. Boldrini L et al (2003) Telomerase in intracranial meningiomas. *Int.J.Mol.Med.* 12 (6):943-947.
20. Bostrom J et al (1998) Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res.* 58 (1):29-33.
21. Bostrom J et al (2001) Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am.J.Pathol.* 159 (2):661-669.
22. Boultonwood J and Wainscoat JS (2007) Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br.J.Haematol.* 138 (1):3-11.
23. Brazma A et al (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat.Genet.* 29 (4):365-371.
24. Breitling R (2006) Biological microarray interpretation: the rules of engagement. *Biochim.Biophys.Acta* 1759 (7):319-327.
25. Bruder CE et al (2001) High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *Hum.Mol.Genet.* 10 (3):271-282.
26. Bruder CE et al (1999) A group of schwannomas with interstitial deletions on 22q located outside the NF2 locus shows no detectable mutations in the NF2 gene. *Hum.Genet.* 104 (5):418-424.
27. Buckley PG et al (2005a) Comprehensive DNA copy number profiling of meningioma using a chromosome 1 tiling path microarray identifies novel candidate tumor suppressor loci. *Cancer Res.* 65 (7):2653-2661.
28. Buckley PG et al (2005b) Identification of genetic aberrations on chromosome 22 outside the NF2 locus in schwannomatosis and neurofibromatosis type 2. *Hum.Mutat.* 26 (6):540-549.
29. Burger RA (2007) Experience with bevacizumab in the management of epithelial ovarian cancer. *J.Clin.Oncol.* 25 (20):2902-2908.
30. Buschges R et al (2002) Allelic gain and amplification on the long arm of chromosome 17 in anaplastic meningiomas. *Brain Pathol.* 12 (2):145-153.
31. Canzian F et al (1996) Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res.* 56 (14):3331-3337.
32. Caye-Thomasen P et al (2005) VEGF and VEGF receptor-1 concentration in vestibular schwannoma homogenates correlates to tumor growth rate. *Otol.Neurotol.* 26 (1):98-101.
33. Charboneau AL et al (2002) Suppression of growth and increased cellular attachment after expression of DAL-1 in MCF-7 breast cancer cells. *Int.J.Cancer* 100 (2):181-188.
34. Choudhary A et al (2006) Radiation induced meningioma with a short latent period following high dose cranial irradiation - case report and literature review. *J.Neurooncol.* 77 (1):73-77.
35. Chow LQ and Eckhardt SG (2007) Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J.Clin.Oncol.* 25 (7):884-896.
36. Dancey J and Sausville EA (2003) Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2 (4):296-313.

37. Das A, Tan WL, and Smith DR (2003) Expression of extracellular matrix markers in benign meningiomas. *Neuropathology*. 23 (4):275-281.
38. Diaz dS et al (2005) High-resolution array-CGH profiling of germline and tumor-specific copy number alterations on chromosome 22 in patients affected with schwannomas. *Hum.Genet.* 118 (1):35-44.
39. Dudoit S and Fridlyand J (2002) A prediction-based resampling method for estimating the number of clusters in a dataset. *Genome Biol.* 3 (7):RESEARCH0036.
40. Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21 (35):5427-5440.
41. Eswarakumar VP, Lax I, and Schlessinger J (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16 (2):139-149.
42. Evans DG et al (2005) Incidence of vestibular schwannoma and neurofibromatosis 2 in the North West of England over a 10-year period: higher incidence than previously thought. *Otol.Neurotol.* 26 (1):93-97.
43. Evans JJ et al (2001) Molecular alterations in the neurofibromatosis type 2 gene and its protein rarely occurring in meningeothelial meningiomas. *J.Neurosurg.* 94 (1):111-117.
44. Fathallah-Shaykh HM et al (2003) Genomic expression discovery predicts pathways and opposing functions behind phenotypes. *J.Biol.Chem.* 278 (26):23830-23833.
45. Ferner RE and O'Doherty MJ (2002) Neurofibroma and schwannoma. *Curr.Opin.Neurol.* 15 (6):679-684.
46. Gerber MA, Bahr SM, and Gutmann DH (2006) Protein 4.1B/differentially expressed in adenocarcinoma of the lung-1 functions as a growth suppressor in meningioma cells by activating Rac1-dependent c-Jun-NH(2)-kinase signaling. *Cancer Res.* 66 (10):5295-5303.
47. Gonzalez-Gomez P et al (2003) CpG island methylation in sporadic and neurofibromatosis type 2-associated schwannomas. *Clin.Cancer Res.* 9 (15):5601-5606.
48. Gusella JF et al (1999) Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Biochim.Biophys.Acta* 1423 (2):M29-M36.
49. Gutmann DH et al (2000) Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum.Mol.Genet.* 9 (10):1495-1500.
50. Gutmann DH et al (2001) The protein 4.1 tumor suppressor, DAL-1, impairs cell motility, but regulates proliferation in a cell-type-specific fashion. *Neurobiol.Dis.* 8 (2):266-278.
51. Hanemann CO et al (2006) Differential gene expression between human schwannoma and control Schwann cells. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 32 (6):605-614.
52. Hanemann CO and Evans DG (2006) News on the genetics, epidemiology, medical care and translational research of Schwannomas. *J.Neurol.* 253 (12):1533-1541.
53. Hansen MR et al (2006) Constitutive neuregulin-1/ErbB signaling contributes to human vestibular schwannoma proliferation. *Glia* 53 (6):593-600.
54. Hardiman G (2004) Microarray platforms--comparisons and contrasts. *Pharmacogenomics.* 5 (5):487-502.
55. Hesson LB, Cooper WN, and Latif F (2007) The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis.Markers* 23 (1-2):73-87.

56. Hildebrandt B et al (2007) Cetuximab: appraisal of a novel drug against colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res.* 176:135-143.
57. Hiratsuka S et al (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (16):9349-9354.
58. Hitotsumatsu T et al (1997) Expression of neurofibromatosis 2 protein in human brain tumors: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.(Berl)* 93 (3):225-232.
59. Howitz MF et al (2000) Incidence of vestibular schwannoma in Denmark, 1977-1995. *Am.J.Otol.* 21 (5):690-694.
60. Hrabec E et al (2007) [Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates--intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors]. *Postepy Biochem.* 53 (1):37-45.
61. Hsu DW, Efrid JT, and Hedley-Whyte ET (1997) Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J.Neurosurg.* 86 (1):113-120.
62. Irving RM et al (1993) Molecular genetic analysis of the mechanism of tumorigenesis in acoustic neuroma. *Arch Otolaryngol.Head Neck Surg.* 119 (11):1222-1228.
63. Jaaskelainen J, Haltia M, and Servo A (1986) Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg.Neurol.* 25 (3):233-242.
64. Jhawar BS et al (2003) Sex steroid hormone exposures and risk for meningioma. *J.Neurosurg.* 99 (5):848-853.
65. Johnson MD, Okediji E, and Woodard A (2004) Transforming growth factor-beta effects on meningioma cell proliferation and signal transduction pathways. *J.Neurooncol.* 66 (1-2):9-16.
66. Kaempchen K et al (2003) Upregulation of the Rac1/JNK signaling pathway in primary human schwannoma cells. *Hum.Mol.Genet.* 12 (11):1211-1221.
67. Kafadar AM et al (2006) C677T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in meningiomas and high-grade gliomas. *Anticancer Res.* 26 (3B):2445-2449.
68. Kawasaki ES (2006) The end of the microarray Tower of Babel: will universal standards lead the way? *J.Biomol.Tech.* 17 (3):200-206.
69. Kedra D et al (1996) Characterization of a second human clathrin heavy chain polypeptide gene (CLH-22) from chromosome 22q11. *Hum.Mol.Genet.* 5 (5):625-631.
70. Kino T et al (2001) Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes Cells* 6 (5):441-454.
71. Kleihues P et al (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 61 (3):215-225.
72. Kletsas D et al (2004) The proinflammatory phenotype of senescent cells: the p53-mediated ICAM-1 expression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1019:330-332.
73. Kluwe L et al (2003) Molecular study of frequency of mosaicism in neurofibromatosis 2 patients with bilateral vestibular schwannomas. *J.Med.Genet.* 40 (2):109-114.
74. Kluwe L et al (2005) Screening for large mutations of the NF2 gene. *Genes Chromosomes.Cancer* 42 (4):384-391.

75. Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 68 (4):820-823.
76. Kondraganti S et al (2006) RNAi-mediated downregulation of urokinase plasminogen activator and its receptor in human meningioma cells inhibits tumor invasion and growth. *Int.J.Oncol.* 28 (6):1353-1360.
77. Konstantinidou AE et al (2003) Hormone receptors in non-malignant meningiomas correlate with apoptosis, cell proliferation and recurrence-free survival. *Histopathology* 43 (3):280-290.
78. Lamszus K (2004) Meningioma pathology, genetics, and biology. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 63 (4):275-286.
79. Lassaletta L et al (2006) DNA methylation of multiple genes in vestibular schwannoma: Relationship with clinical and radiological findings. *Otol.Neurol.* 27 (8):1180-1185.
80. Lee JY et al (2004) Loss of heterozygosity analysis of benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Neurosurgery* 55 (5):1163-1173.
81. Lekan Deprez RH et al (1995) Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. *Oncogene* 10 (8):1521-1528.
82. Leone PE et al (1999) NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 18 (13):2231-2239.
83. Leone PE et al (2003) Implications of a RAD54L polymorphism (2290C/T) in human meningiomas as a risk factor and/or a genetic marker. *BMC.Cancer* 3:6.
84. Liu Y et al (2005) Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Hum.Pathol.* 36 (4):416-425.
85. Ljubimova JY et al (2001) Gene expression abnormalities in human glial tumors identified by gene array. *Int.J.Oncol.* 18 (2):287-295.
86. Lockhart DJ et al (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat.Biotechnol.* 14 (13):1675-1680.
87. Lomas J et al (2004) Methylation status of TP73 in meningiomas. *Cancer Genet.Cytogenet.* 148 (2):148-151.
88. Lomas J et al (2002) Loss of chromosome 22 and absence of NF2 gene mutation in a case of multiple meningiomas. *Hum.Pathol.* 33 (3):375-378.
89. Lomas J et al (2005) Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas. *Genes Chromosomes.Cancer* 42 (3):314-319.
90. Los M, Roodhart JM, and Voest EE (2007) Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist.* 12 (4):443-450.
91. Louis DN et al (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.(Berl)* 114 (2):97-109.
92. Louis DN, Ramesh V, and Gusella JF (1995) Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatosis 2 and related tumors. *Brain Pathol.* 5 (2):163-172.
93. Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ (2000a) Meningiomas. In: World Health Classification of Tumors: Pathology and genetics of tumors of the nervous system. **IARC Press:** Lyon.

94. Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ (2000b) Meningiomas. In: World Health Classification of Tumors: Pathology and geentics of tumors of the nervous system. **IARC Press:** Lyon.
95. Lusa E and Gutmann DH (2004) Meningioma: an update. *Curr.Opin.Neurol.* 17 (6):687-692.
96. Lusa EA et al (2005) Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res.* 65 (16):7121-7126.
97. Lutchman M and Rouleau GA (1995) The neurofibromatosis type 2 gene product, schwannomin, suppresses growth of NIH 3T3 cells. *Cancer Res.* 55 (11):2270-2274.
98. MacCollin M et al (2005) Diagnostic criteria for schwannomatosis. *Neurology* 64 (11):1838-1845.
99. Maes L et al (2005) The hTERT-protein and Ki-67 labelling index in recurrent and non-recurrent meningiomas. *Cell Prolif.* 38 (1):3-12.
100. Mantripragada KK et al (2003) High-resolution profiling of an 11 Mb segment of human chromosome 22 in sporadic schwannoma using array-CGH. *Int.J.Oncol.* 22 (3):615-622.
101. Martinez-Glez V et al (2005) Mutational analysis of the DAL-1/4.1B tumour-suppressor gene locus in meningiomas. *Int.J.Mol.Med.* 16 (4):771-774.
102. Martinez-Glez V et al (2007) Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) screening in meningioma. *Cancer Genet.Cytogenet.* 173 (2):170-172.
103. Mautner VF et al (2002) Vestibular schwannoma growth in patients with neurofibromatosis Type 2: a longitudinal study. *J.Neurosurg.* 96 (2):223-228.
104. McClatchey AI and Giovannini M (2005) Membrane organization and tumorigenesis--the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes Dev.* 19 (19):2265-2277.
105. McMahon GA et al (2001) Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 276 (36):33964-33968.
106. McShane LM et al (2002) Methods for assessing reproducibility of clustering patterns observed in analyses of microarray data. *Bioinformatics.* 18 (11):1462-1469.
107. Mehta RP et al (2006) What's new in skull base medicine and surgery? Skull Base Committee Report. *Otolaryngol.Head Neck Surg.* 135 (4):620-630.
108. Mello-Coelho V and Hess KL (2005) A conceptual and practical overview of cDNA microarray technology: implications for basic and clinical sciences. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 38 (10):1543-1552.
109. Mendiola M et al (1999) Search for mutations of the hRAD54 gene in sporadic meningiomas with deletion at 1p32. *Mol.Carcinog.* 24 (4):300-304.
110. Menon AG et al (1997) Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene* 14 (5):611-616.
111. Michiels S, Koscielny S, and Hill C (2005) Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 365 (9458):488-492.
112. Morrison H et al (2001) The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev.* 15 (8):968-980.
113. Moyhuddin A et al (2003) Somatic mosaicism in neurofibromatosis 2: prevalence and risk of disease transmission to offspring. *J.Med.Genet.* 40 (6):459-463.

114. Muller P et al (1999) Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clin.Cancer Res.* 5 (11):3569-3577.
115. Murakami M et al (2003) A consistent region of deletion on 1p36 in meningiomas: identification and relation to malignant progression. *Cancer Genet.Cytogenet.* 140 (2):99-106.
116. Nahta R and Esteva FJ (2007) Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene* 26 (25):3637-3643.
117. Nakasu S et al (1987) Incidental meningiomas in autopsy study. *Surg.Neurol.* 27 (4):319-322.
118. Neff BA et al (2006) The molecular biology of vestibular schwannomas: dissecting the pathogenic process at the molecular level. *Otol.Neurol.* 27 (2):197-208.
119. Nunes F et al (2005) Inactivation patterns of NF2 and DAL-1/4.1B (EPB41L3) in sporadic meningioma. *Cancer Genet.Cytogenet.* 162 (2):135-139.
120. O'Donovan N and Crown J (2007) EGFR and HER-2 antagonists in breast cancer. *Anticancer Res.* 27 (3A):1285-1294.
121. Oh MK et al (2003) Genetic heterogeneity of stably transfected cell lines revealed by expression profiling with oligonucleotide microarrays. *J.Cell Biochem.* 90 (5):1068-1078.
122. Okada M et al (2004) Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with the recurrence of intracranial meningiomas. *J.Neurooncol.* 66 (1-2):29-37.
123. Ono M and Kuwano M (2006) Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin.Cancer Res.* 12 (24):7242-7251.
124. Patronas NJ et al (2001) Intramedullary and spinal canal tumors in patients with neurofibromatosis 2: MR imaging findings and correlation with genotype. *Radiology* 218 (2):434-442.
125. Pelz AF et al (2007) Novel chromosomal aberrations in a recurrent malignant meningioma. *Cancer Genet.Cytogenet.* 174 (1):48-53.
126. Perry A et al (1999) "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 85 (9):2046-2056.
127. Peters N et al (1998) Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 24 (1):3-8.
128. Peyrard M et al (1994) Characterization of a new member of the human beta-adaptin gene family from chromosome 22q12, a candidate meningioma gene. *Hum.Mol.Genet.* 3 (8):1393-1399.
129. Peyrard M et al (1996) Structure of the promoter and genomic organization of the human beta'-adaptin gene (BAM22) from chromosome 22q12. *Genomics* 36 (1):112-117.
130. Peyrard M et al (1999) The human LARGE gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (2):598-603.
131. Powers HJ (2005) Interaction among folate, riboflavin, genotype, and cancer, with reference to colorectal and cervical cancer. *J.Nutr.* 135 (12 Suppl):2960S-2966S.
132. Provias J et al (1997) Meningiomas: role of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in angiogenesis and peritumoral edema. *Neurosurgery* 40 (5):1016-1026.
133. Radmacher MD, McShane LM, and Simon R (2002) A paradigm for class prediction using gene expression profiles. *J.Comput.Biol.* 9 (3):505-511.

134. Ramaswamy S et al (2001) Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (26):15149-15154.
135. Rey JA et al (1988) Chromosomal involvement secondary to -22 in human meningiomas. *Cancer Genet.Cytogenet.* 33 (2):275-290.
136. Rhodes DR et al (2004) Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 (25):9309-9314.
137. Riemenschneider MJ, Perry A, and Reifenberger G (2006) Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol.* 5 (12):1045-1054.
138. Robb VA et al (2005) Membrane localization of the U2 domain of Protein 4.1B is necessary and sufficient for meningioma growth suppression. *Oncogene* 24 (11):1946-1957.
139. Robb VA et al (2003) Identification of a third Protein 4.1 tumor suppressor, Protein 4.1R, in meningioma pathogenesis. *Neurobiol.Dis.* 13 (3):191-202.
140. Rogg JM et al (2005) Prevalence of hydrocephalus in 157 patients with vestibular schwannoma. *Neuroradiology* 47 (5):344-351.
141. Roos WP and Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol.Med.* 12 (9):440-450.
142. Rosette C et al (2005) Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26 (5):943-950.
143. Rouleau GA et al (1993c) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363 (6429):515-521.
144. Rouleau GA et al (1993a) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363 (6429):515-521.
145. Rouleau GA et al (1993b) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363 (6429):515-521.
146. Rouleau GA et al (1990) Flanking markers bracket the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene on chromosome 22. *Am.J.Hum.Genet.* 46 (2):323-328.
147. Rutledge MH et al (1994) Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes.Cancer* 10 (2):122-130.
148. Salajegheh M, Rudnicki A, and Smith TW (2005) Expression of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in primary central nervous system neoplasms. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 13 (2):184-189.
149. Sasaki T, Hankins GR, and Helm GA (2003) Comparison of gene expression profiles between frozen original meningiomas and primary cultures of the meningiomas by GeneChip. *Neurosurgery* 52 (4):892-898.
150. Sayagues JM et al (2006) Microarray-based analysis of spinal versus intracranial meningiomas: different clinical, biological, and genetic characteristics associated with distinct patterns of gene expression. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 65 (5):445-454.
151. Schena M et al (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 (5235):467-470.

152. Schmitz U et al (2001) INI1 mutations in meningiomas at a potential hotspot in exon 9. *Br.J.Cancer* 84 (2):199-201.
153. Schneider J et al (1983) [Tumors of the central nervous system in biopsy and autopsy material. 7th communication: neurinomas and neurofibromatoses with CNS involvement]. *Zentralbl.Allg.Pathol.* 127 (5-6):305-314.
154. Scoles DR et al (2005) HRS inhibits EGF receptor signaling in the RT4 rat schwannoma cell line. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 335 (2):385-392.
155. Siddique K et al (2003) Expression of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and urokinase plasminogen activator in human meningiomas. *Int.J.Oncol.* 22 (2):289-294.
156. Simon R et al (2003a) Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J.Natl.Cancer Inst.* 95 (1):14-18.
157. Simon R et al (2003b) Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J.Natl.Cancer Inst.* 95 (1):14-18.
158. Simon RM and Dobbin K (2003) Experimental design of DNA microarray experiments. *Biotechniques* Suppl:16-21.
159. Smith JS et al (2007) Association between absence of epidermal growth factor receptor immunoreactivity and poor prognosis in patients with atypical meningioma. *J.Neurosurg.* 106 (6):1034-1040.
160. Sobel RA (1993) Vestibular (acoustic) schwannomas: histologic features in neurofibromatosis 2 and in unilateral cases. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 52 (2):106-113.
161. Soff GA et al (1995) Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J.Clin.Invest* 96 (6):2593-2600.
162. Strumberg D et al (2007) Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *Oncologist.* 12 (4):426-437.
163. Sulman EP, White PS, and Brodeur GM (2004) Genomic annotation of the meningioma tumor suppressor locus on chromosome 1p34. *Oncogene* 23 (4):1014-1020.
164. Surace EI et al (2004) Loss of tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) expression in meningioma correlates with increased malignancy grade and reduced patient survival. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 63 (10):1015-1027.
165. Szijan I et al (2003) NF2 tumor suppressor gene: a comprehensive and efficient detection of somatic mutations by denaturing HPLC and microarray-CGH. *Neuromolecular.Med.* 3 (1):41-52.
166. Tarabykina S et al (2007) Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration. *Curr.Cancer Drug Targets.* 7 (3):217-228.
167. Thaxton C et al (2007) Phosphorylation of the NF2 tumor suppressor in Schwann cells is mediated by Cdc42-Pak and requires paxillin binding. *Mol.Cell Neurosci.* 34 (2):231-242.
168. Thiagalingam S et al (2002) Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Curr.Opin.Oncol.* 14 (1):65-72.

169. Thyrell L et al (2004) Interferon alpha-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 279 (23):24152-24162.
170. Tikoo A et al (1994) An anti-Ras function of neurofibromatosis type 2 gene product (NF2/Merlin). *J.Biol.Chem.* 269 (38):23387-23390.
171. Tran YK et al (1999) A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res.* 59 (1):35-43.
172. Trofatter JA et al (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 75 (4):826.
173. Tse JY et al (1997) Loss of heterozygosity of chromosome 14q in low- and high-grade meningiomas. *Hum.Pathol.* 28 (7):779-785.
174. Tsukita S et al (1994) ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J.Cell Biol.* 126 (2):391-401.
175. van Tilborg AA et al (2006) Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. *J.Pathol.* 208 (4):564-573.
176. Wada K et al (2004) Chromosomal and genetic aberrations differ with meningioma subtype. *Brain Tumor Pathol.* 21 (3):127-133.
177. Wada K et al (2005) Chromosomal and genetic abnormalities in benign and malignant meningiomas using DNA microarray. *Neurol.Res.* 27 (7):747-754.
178. Warren C et al (2003) Identification of recurrent regions of chromosome loss and gain in vestibular schwannomas using comparative genomic hybridisation. *J.Med.Genet.* 40 (11):802-806.
179. Watson MA et al (2002) Molecular characterization of human meningiomas by gene expression profiling using high-density oligonucleotide microarrays. *Am.J.Pathol.* 161 (2):665-672.
180. Weber RG et al (1997) Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (26):14719-14724.
181. Wellenreuther R et al (1995) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am.J.Pathol.* 146 (4):827-832.
182. Welling DB et al (2002) cDNA microarray analysis of vestibular schwannomas. *Otol.Neurotol.* 23 (5):736-748.
183. Wen PY and Drappatz J (2006) Novel therapies for meningiomas. *Expert.Rev.Neurother.* 6 (10):1447-1464.
184. Wertelecki W et al (1988) Neurofibromatosis 2: clinical and DNA linkage studies of a large kindred. *N.Engl.J.Med.* 319 (5):278-283.
185. Weston CR and Davis RJ (2002) The JNK signal transduction pathway. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 12 (1):14-21.
186. Wolff RK et al (1992) Analysis of chromosome 22 deletions in neurofibromatosis type 2-related tumors. *Am.J.Hum.Genet.* 51 (3):478-485.
187. Wright GW and Simon RM (2003) A random variance model for detection of differential gene expression in small microarray experiments. *Bioinformatics.* 19 (18):2448-2455.

188. Wrobel G et al (2005) Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int.J.Cancer* 114 (2):249-256.
189. Wu S, Murrell GA, and Wang Y (2002) Interferon-alpha (Intron A) upregulates urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression. *Cancer Immunol.Immunother.* 51 (5):248-254.
190. Xiao GH et al (2002) p21-activated kinase links Rac/Cdc42 signaling to merlin. *J.Biol.Chem.* 277 (2):883-886.
191. Yamasaki F et al (2000) Recurrence of meningiomas. *Cancer* 89 (5):1102-1110.
192. Zang KD and Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216 (5110):84-85.
193. Zankl H and Zang KD (1972) Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetik.* 14 (2):167-169.